

Національна академія наук України  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису

Горбатюк Ірина Романівна

**ОПТИМІЗАЦІЯ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ  
БІОТЕХНОЛОГІЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ *TRITICUM AESTIVUM* В  
КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ТА МЕТОДОМ *IN PLANTA***

03.00.20 – біотехнологія

Науковий керівник:  
кандидат біологічних наук  
Моргун Б.В.

Київ – 2016

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП .....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	18
1.1. Пшениця м'яка як об'єкт біотехнологічного дослідження .....	18
1.2. Особливості морфогенезу м'якої пшениці <i>Triticum aestivum</i> в культурі <i>in vitro</i> .....	21
1.2.1. Отримання калюсної культури <i>Triticum aestivum</i> в умовах <i>in vitro</i> .....	21
1.2.2. Вплив біологічно активних речовин на утворення калюсу .....	23
1.2.3. Особливості морфогенезу у пшениці м'якої <i>Triticum aestivum</i> .....	25
1.3. Експлант як ключовий фактор успішної біотехнології злаків.....	32
1.4. Біотехнологічні методи перенесення чужорідної ДНК в рослинний організм.....	36
1.4.1. Отримання біотехнологічних рослин шляхом <i>Agrobacterium</i> -опосередкованого перенесення генів.....	37
1.4.2. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація <i>in planta</i> як метод отримання трансгенних рослин.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	54
2.1. Матеріал досліджень.....	54
2.2. Одержання первинної калюсної культури пшениці та умови культивування.....	55
2.3. Визначення впливу синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту на частоту регенерації з калюсу пшениці м'якої.....	56
2.4. Генетичні вектори та агробактеріальні штами.....	57
2.5. Визначення інгібуючого впливу антибіотиків на бактеріальні клітини <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	58

2.6. Визначення впливу антибіотиків на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів пшениці.....	59
2.7. Гістологічне дослідження калюсу пшениці, отриманого на живильному середовищі, доповненому цефтриаксоном.....	60
2.8. Визначення відносної швидкості росту рослин.....	60
2.9. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація пшениці в умовах <i>in vitro</i> .....	61
2.10. Генетична трансформація пшениці за допомогою методу <i>in planta</i> .	61
2.11. Молекулярно-генетичний аналіз рослин.....	62
2.12. Статистичний аналіз результатів.....	65
РОЗДІЛ 3. ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ <i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ <i>TRITICUM AESTIVUM IN VITRO</i> .....	66
3.1. Вплив регуляторів росту на частоту регенерації пагонів з калюсу м'якої пшениці.....	66
3.1.1. Застосування 6-бензиламінопурину для регенерації пагонів пшениці м'якої .....	66
3.1.2. Вплив синтетичних ауксинподібних регуляторів росту на регенерацію пагонів з калюсу м'якої пшениці сортів Зимоярка та Подолянка.....	70
3.2. Застосування антибіотиків β-лактамної групи для елімінації <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	77
3.3. Вплив антибіотиків на частоту утворення морфогенного калюсу, регенерацію пагонів та ризогенез пшениці .....	83
3.4. Вплив антибіотика цефтриаксону на морфологію калюсу і регенерацію пагонів пшениці сортів Зимоярка та Подолянка.....	102
3.5. Антибіотики тиментин та цефтриаксон як регулятори росту пшениці .....	110

РОЗДІЛ	4.	<i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСЕРЕДКОВАНА	
ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> .....			121
4.1. Перенесення чужорідних цільових генів <i>in vitro</i> у рослинний організм за допомогою <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....			121
4.2. Отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до гербіциду фосфінотрицину (Баста®).....			130
РОЗДІЛ	5.	<i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСЕРЕДКОВАНА	
ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ МЕТОДОМ <i>IN PLANTA</i> .....			137
5.1. Оптимізація методики <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації <i>in planta</i> пшениці <i>T. aestivum</i> сорту Подолянка.....			137
5.2. Отримання біотехнологічних рослин пшениці м'якої сорту Подолянка, стійких до гербіциду фосфінотрицину, методом <i>in planta</i> ....			143
5.3. Дослідження експресії трансгенів у рослинах пшениці <i>T. aestivum</i> ..			148
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....			154
ВИСНОВКИ.....			158
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....			160

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБК	–	абсцизова кислота
БА	–	бензиладенін
БАП	–	6-бензиламінопурин
2,4-Д	–	2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією
ІМК	–	індоліл-3-масляна кислота
ІОК	–	$\beta$ -індолілоцтова кислота
КУО	–	колонії утворюючі організми
МС	–	живильне середовище Мурасіге-Скуга
НОК	–	$\alpha$ -нафтилоцтова кислота
ПАР	–	поверхнево активні речовини
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
п. н.	–	пар нуклеотидів
ПТ	–	пилкова трубка
ТДЗ	–	3-(1,2,3-тіадіазолін-5)-1-фенілсечовина
Т-ДНК	–	ділянка ДНК бінарного вектора, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації (від англ. Transferred DNA)
<i>bar</i>	–	ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази
<i>Сb</i>	–	карбеніцилін
<i>Сt</i>	–	цефтриаксон
<i>Сf</i>	–	цефотаксим
<i>Gm</i>	–	гентаміцин
<i>gus, uidA</i>	–	ген $\beta$ -глюкуронідази
<i>hpt</i>	–	ген гігроміцинофосфотрансферази
<i>Km</i>	–	канаміцин

LB	–	середовище для культивування мікроорганізмів
<i>nptII</i>	–	ген неоміцинофосфотрансферази
OD	–	оптична щільність бактеріальної суспензії
Rf	–	рифампіцин
<i>sgfp</i>	–	синтетичний ген зеленого флуоресцентного білка
Spc	–	спектиноміцин
Tm	–	тиментин
<i>yfp</i>	–	ген жовтого флуоресцентного білка

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Пшениця (*Triticum aestivum* L.) відіграє провідну роль у харчовому забезпеченні людства. Завдяки високій екологічній пластичності вона має широкий ареал розповсюдження і займає домінуючі площі культивування у світі [1, 2]. Більше 90% світових посівів припадає саме на м'яку пшеницю [3]. Будучи другою за величиною врожайності у світі, вона виступає основним джерелом поживних речовин, таких, як білки, вуглеводи, ліпіди, клітковина та вітаміни у раціоні людини. Станом на 2013 р. виробництво пшениці у світі складало 713 183 тис. тон, що на 127 492 тис. тон перевищує виробництво пшениці у 2010 році [4]. За даними USDA (United States Department of Agriculture) світове виробництво пшениці у 2015 році становило 719 млн. тон, Україна виробила 22 млн. тон пшениці [5]. Зважаючи на демографічну, продовольчу, екологічну ситуації у світі значення пшениці невпинно зростатиме [1, 6]. З огляду на це, проблема підвищення врожайності пшениці, якості зерна, стійкості до абіотичних та біотичних стресових факторів навколишнього середовища набуває неабиякої актуальності. Поряд із традиційними методами селекції рослин, які спрямовані на отримання високопродуктивних сортів важливих сільськогосподарських культур, широкого застосування набувають біотехнологічні прийоми. З їх допомогою стає можливим вивчення фізіологічних і генетичних процесів шляхом збільшення генетичного різноманіття.

Використовуючи методи генетичної трансформації *in vitro*, вчені зіштовхуються з труднощами, а саме: довготривалістю експериментів, залежністю ефективності трансформації від генотипу досліджуваного об'єкту, можливістю появи соматоклонів. Окрім цього, часто виникають проблеми, пов'язані з регенерацією трансформантів. Так, у однодольних рослин регенерація взагалі обмежена низьким морфогенетичним потенціалом, внаслідок чого отримання фертильних рослин утруднено [7-8].

Переважно генетичну трансформацію рослин здійснюють за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* – опосередкований перенос генів та шляхом біолістичної трансформації – прямий перенос генів. Вперше успішна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація була проведена в 1987 році на *Arabidopsis thaliana* [9]. З того часу її широко застосовують для сільськогосподарських культур: томатів [10], рису та кукурудзи [11-12], ячменю [13], ріпаку [14-15] тощо. За останні три десятиліття число видів рослин, які можуть бути трансформовані за допомогою *Agrobacterium* значно зросло. Такий прогрес став можливий завдяки усуненню бар'єру (відсутність ацеторсирінгону), що перешкоджав успішній агробактеріальній трансформації однодольних, зокрема злакових [16]. Вперше повідомлення про успішну трансформацію пшениці біолістичним методом було опубліковано у 1992 році [17]. Спершу увага зосереджувалась, в основному, на залученні генів, які б покращували хлібопекарські властивості пшениці. Проте, такий підхід не давав можливості у повній мірі підвищити якість зерна [18]. У подальшому застосування технології генетичної трансформації дозволило отримати рослини пшениці з покращеною якістю зерна шляхом підвищення вмісту білка, а також стійкі до гербіцидів та різного роду шкідників [19-20].

Завданням генетичної трансформації є не лише отриманням трансгенних ліній пшениці, а й надійна та стабільна експресія цільових генів та адаптація отриманих трансформантів до нестерильних умов [21].

На сьогодні не розроблено жодного біотехнологічного методу, що забезпечив би високу ефективність генетичної трансформації пшениці, звів до мінімуму втрату трансгенних рослин на етапі пристосування до умов *ex vitro*, зменшив собівартість і довготривалість експериментів та дозволив подолати ряд труднощів, які пов'язані з даними процесами. Пошуки альтернативних, більш досконалих біотехнологічних методів, які б забезпечували високий економічний ефект, сприятимуть отриманню ліній

важливих сільськогосподарських культур, що володіють покращеними агрономічними якостями.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Робота виконувалась у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України в рамках держбюджетних тем «Вивчення молекулярно-генетичних особливостей генетично модифікованих культурних рослин та встановлення закономірностей функціонування трансгенів» (номер держреєстрації 0113U003100, 2013 – 2015 рр.), а також за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» (номер держреєстрації 0110U006082, 2014 р.) та за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» «Використання молекулярних та клітинних технологій для отримання біотехнологічних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіциду гліфосату» (номер держреєстрації 0115U004187, 2015 р.).

**Мета дослідження.** Метою роботи була оптимізація методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для виду *Triticum aestivum* в культурі *in vitro* та методом *in planta*, а також отримання біотехнологічних рослин пшениці, стійких до фосфінотрицину.

### **Завдання дослідження**

- 1) Визначити оптимальний вік калюсної культури з апікальних меристем 3-добових проростків пшениці та підібрати умови регенерації пагонів.
- 2) Оптимізувати методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*, визначити оптичну щільність бактеріальної суспензії, за якої

відбувається генетична трансформація пшениці, та ефективну систему елімінації *A. tumefaciens*.

- 3) Встановити вплив антибіотиків β-лактамної групи тиментину та цефтриаксону на морфогенетичні процеси у пшениці.
- 4) Відпрацювати методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *in planta*.
- 5) Отримати трансгенні рослини пшениці, стійкі до антибіотику канаміцину та гербіциду фосфінотрицину (Баста®) за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro* та методом *in planta*.
- 6) Провести молекулярно-біологічний аналіз отриманих рослин.

**Об'єкт дослідження** – *Agrobacterium*-опосередкована трансформація в умовах *in vitro* та методом *in planta*.

**Предмет дослідження** – Умови проведення генетичної трансформації пшениці *Triticum aestivum*, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens* в культурі *in vitro* та методом *in planta*.

#### **Методи досліджень**

Метод культури тканин *in vitro* застосовували для отримання калюсних культур та регенерації рослин; молекулярні методи: виділення загальної ДНК та РНК, метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), ЗТ (зворотна транскрипція)-ПЛР, електрофорез продуктів ампліфікації ДНК використовували для детекції трансгенів і підтвердження їх експресії у рослинах пшениці, отриманих за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та методом *in planta*; гістологічний метод застосовували для встановлення структурних особливостей морфогенного калюсу двох генотипів пшениці, які виникають під впливом цефтриаксону; методи статистичної обробки використано для аналізу отриманих експериментальних даних та підтвердження їх достовірності.

## **Наукова новизна одержаних результатів**

Вперше розроблено модифіковані живильні середовища, використання яких дозволило підвищити частоту регенерації пшениці та пришвидшити отримання трансформантів. Встановлено співвідношення регуляторів росту (синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – дикамби і піклораму та цитокініну – 6-бензиламінопурину), які необхідні для активного утворення меристематичних осередків у калюсі та подальшої регенерації пагонів і утворення коренів пшениці.

Вперше встановлено елімінуючу клітини *A. tumefaciens* штамів АВІ та GV3101 концентрацію антибіотика β-лактамної групи цефтриаксону.

Вперше у світі вивчено дію цефтриаксону на мофогенетичні процеси у пшениці. Встановлено, що даний антибіотик пришвидшує появу меристематичних осередків, підвищує частоту регенерації пагонів пшениці м'якої *T. aestivum* та стимулює вкорінення пагонів. Даний антибіотик дозволяє отримати рослину-регенерант без етапу вкорінення на спеціальному середовищі для ризогенезу. Такі рослини з розвинутою кореневою системою легше адаптуються до нестерильних умов. Встановлено, що антибіотик цефтриаксон володіє ріст регулюючою активністю – при його додаванні в безгормональне середовище стимулюються морфогенетичні процеси. Застосування антибіотика цефтриаксону під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дозволяє пришвидшити процес отримання трансгенних рослин пшениці.

Вперше отримано трансформанти пшениці *Triticum aestivum* сортів Подолянка та Зимоярка, стійкі до фосфіотрицину, шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та *in vitro*.

**Практичне значення отриманих результатів.** Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*, що дозволило отримати біотехнологічні рослини пшениці, стійкі гербіциду фосфіотрицину, а саме:

- підібрано антибіотики для ефективного усунення бактеріальної контамінації під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*, які водночас стимулюють регенераційні процеси, тобто проявляють властивості регуляторів росту;
- для ефективної регенерації рослин пшениці *Triticum aestivum* запропоновано безгормональне модифіковане середовище МС (вітаміни за Гамборгом, AgNO<sub>3</sub>), доповнене антибіотиком цефтриаксоном, яке дозволяє отримати рослину-регенерант без використання спеціального середовища для вкорінення;
- оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці сортів Подолянка та Зимоярка *in planta*;
- отримано трансформанти пшениці сортів вітчизняної селекції, стійкі до фосфінотрицину.

Підібрані умови проведення генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium* дають змогу пришвидшити отримання рослин, стійких до гербіцидів, зокрема Баста®.

Матеріали дисертаційної роботи можуть представляти інтерес для науково-дослідних та навчальних закладів, зокрема під час викладання біотехнології та генетики рослин.

**Особистий внесок здобувача.** Результати досліджень, представлені у дисертаційній роботі, одержано автором у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Горбатюк Ірини Романівни. Автором особисто відібрано і критично проаналізовано сучасну вітчизняну та зарубіжну наукову літературу за темою дослідження. Концепцію роботи, план і методологію експериментальних досліджень, основні результати і висновки роботи сформульовані дисертантом разом із науковим керівником к. б. н. Моргуном Богданом Володимировичем.

Проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* здійснювали спільно з к. б. н. Баволом А. В., к. б. н. Банниковою М. О. Дослідження впливу антибіотиків тиментину та цефтриаксону на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* і регенерацію пагонів *in vitro* проводили разом із к. б. н. Банниковою М. О., Гнатюк І. С. Визначення впливу регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сортів Подолянка і Зимоярка та гістологічний аналіз проводили спільно з к. б. н. Банниковою М. О., к. б. н. Баволом А. В., к. б. н. Нужиною Н. В., Тараненком А. М., Гнатюк І. С. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину рослин пшениці сорту Зимоярка за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* здійснювали разом із к. б. н. Щербак Н. Л., к. б. н. Банниковою М. О., Великожон Л. Г., д. б. н. Кучуком М. В. Результати досліджень викладено в спільних публікаціях, авторство здобувача в яких складає 60–80%.

#### **Апробація результатів.**

Основні положення дисертації були представлені на науково-практичних конференціях:

*міжнародних*: Международной научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 13–16 травня 2014 року), III Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти» (Харків, 11–13 листопада 2014 року), Conference of Young Scientists (Kyiv, September 21–25, 2015), International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (Lviv, October 11–13, 2015), IX Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22–26 вересня 2014 року), X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, 14–18 вересня 2015 року);

всеукраїнських: III Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звернення та надії» (Київ, 15–16 травня 2014 року), Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 28–30 жовтня 2014 року), V Науково-практичній конференції «Біологічні дослідження – 2015» для молодих учених і студентів (Житомир, 11–12 березня 2015 року), IX Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 170-й річниці від дня народження І. І. Мечникова, «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 24 квітня 2015 року);

звітно-наукових семінарах відділу молекулярної генетики ІКБГІ НАН України.

#### **Публікації.**

За результатами досліджень опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях України (з них 3 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 8 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

1. Горбатюк І. Р. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подолянка та ярого сорту Bobwhite / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, Б. В. Моргун // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 15. – С. 35–39.
2. Горбатюк І. Р. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum* / І. Р. Горбатюк, І. С. Гнатюк, М. О. Банникова, Б. В. Моргун // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 136–140.
3. Горбатюк І. Р. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка / І. Р. Горбатюк, І. С. Гнатюк,

- М.О. Банникова, А. М. Тараненко, Б. В. Моргун // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47. – С. 514–525.
4. Горбатюк І. Р. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, М. О. Банникова, Б. В. Моргун // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2015. – Вип. 24. – С. 47–53.
  5. Gorbatyuk I. R. Effect of antibiotic ceftriaxone on elimination of ABI and GV3101 strains of *Agrobacterium tumefaciens* / I. R. Gorbatyuk, I. S. Gnatyuk, M. A. Bannikova // Biopolymers and Cell. – 2015. – V. 31(6). – P. 455–457.
  6. Горбатюк І. Р. Отримання стійких до гербіциду фосфіотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro* / І. Р. Горбатюк, Н. Л. Щербак, М. О. Банникова, Л. Г. Великожон, М. В. Кучук, Б. В. Моргун // Физиология растений и генетика. – 2016. – Т. 48 (1). – С. 65–74.
  7. Горбатюк І. Р. Трансформація *in planta* м'якої озимої пшениці сорту Подолянка за допомогою агробактерій / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, Б. В. Моргун // Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 15–16 травня, 2014 р.) – С. 19–20.
  8. Горбатюк І. Р. Оптимізація середовища для регенерації м'якої пшениці за умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, Б. В. Моргун // Материалы Международной научно-практической конференции молодых учёных «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 13–16 травня, 2014 р.) – С. 42.
  9. Горбатюк І. Р. Вплив синтетичного регулятора росту *dicamba* на регенерацію м'якої пшениці з калюсу / І. Р. Горбатюк, А. В. Голубенко,

- А. В. Бавол, І. С. Гнатюк, Б. В. Моргун // Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 28–30 жовтня, 2014 р.) – С. 73–74.
10. Горбатюк І. Р. Оптимізація умов регенерації калюсної тканини м'якої пшениці за допомогою рослинних регуляторів росту синтетичного походження / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, А. В. Голубенко, І. С. Гнатюк, Б. В. Моргун // Тези доповідей III Міжнародної наукової конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти» (Харків, 11–13 листопада, 2014 р.) – С. 56–57.
11. Горбатюк І. Р. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці за допомогою методу *in planta* / І. Р. Горбатюк, М. О. Банникова, Б. В. Моргун // Матеріали V Науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2015» для молодих учених і студентів (Житомир, 11–12 березня, 2015 р.) – С. 437–439.
12. Гнатюк І. С. Інгібуюча дія тиментину на *Agrobacterium tumefaciens* / І. С. Гнатюк, І. Р. Горбатюк, М. О. Банникова, Б. В. Моргун // Матеріали IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 170-й річниці від дня народження І. І. Мечникова «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 24 квітня, 2015 р.) – С. 105.
13. Gorbatyuk I. R. Effect of antibiotic ceftriaxone on elimination of *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of *Triticum aestivum in vitro* / I. R. Gorbatyuk, I.S. Gnatyuk, M. O. Bannikova, B. V. Morgun // In abstract: Conference of Young Scientists (Kyiv, September 21–25, 2015) – P. 107.
14. Gorbatyuk I. R. Effect of antibiotics timentin and ceftriaxone at the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration *in vitro* bread wheat *Triticum aestivum* / I. R. Gorbatyuk, I. S. Gnatyuk, M. O. Bannikova,

B. V. Morgun // In abstract: International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (Lviv, October 11–13, 2015) – P. 90.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох експериментальних розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел. Роботу викладено на 192 сторінках машинописного тексту, враховуючи 55 рисунків і 16 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 293 найменування.

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Пшениця м'яка як об'єкт біотехнологічного дослідження

Пшениця (*Triticum aestivum* L.) є однією з чотирьох основних світових зернових культур. Її батьківщиною вважається Передня Азія. Рід *Triticum* налічує 27 видів, з яких 4 – дигаплоїди ( $2n = 14$ ), 14 видів – тетраплоїди ( $2n = 28$ ), у т.ч. тверда пшениця (*T. durum*), 9 видів – гексаплоїди ( $2n = 42$ ), у т.ч. м'яка пшениця (*T. aestivum*), а також 3 види, створені в лабораторних умовах – октаплоїди ( $2n = 56$ ). Для *T. aestivum* властивий складний геном. Він складається з трьох геномів ABD. Щоб набути сучасного вигляду, пшениця пройшла тривалий еволюційний шлях [19]. Міжродова гібридизація дозволила встановити походження геномів пшениці. Геном А походить з однієї із стародавніх однозернянок *T. urartu*; геном В – від давнього виду *Aegilops speltoides*. Вважають, що гексаплоїдна пшениця виникла в результаті об'єднання геномів тетраплоїдної *T. turgidum*, ( $2n=28$ , АВ-геном) і *Aegilops squarrosa* L. (D-геном) [22-23] (рис 1.1). Саме присутність D геному забезпечує унікальні хлібопекарські властивості гексаплоїдної пшениці. Гексаплоїдна природа пшениці м'якої дозволяє їй зберігати досить високу життєздатність в моносомному, і навіть нулісомному стані (внаслідок дублювання генів).

Всередині двадцятого століття через зміни кліматичних умов, а також вплив несприятливих екологічних факторів, гостро постала проблема зниження врожайності пшениці, а відтак і її світового виробництва [24]. Одним із шляхів вирішення даного питання було запровадження в 1944 році (Мексика) програми отримання нових сортів, стійких до хвороб з високою врожайністю («Зелена Революція») [25]. В рамках цієї програми Норман Борлоуг вперше отримав напівкарликову пшеницю, яка виявилася стійкою до хвороб і характеризувалася високою врожайністю. Для створення таких сортів залучали гени карликовості. Такі рослини мали короткі, сильні стебла

та не вилягали під вагою насіння [26]. Отримані таким чином нові сорти пшениці з більш високим виходом зерна і підвищеною стійкістю до патогенів витіснили традиційні сорти майже в усіх країнах світу.

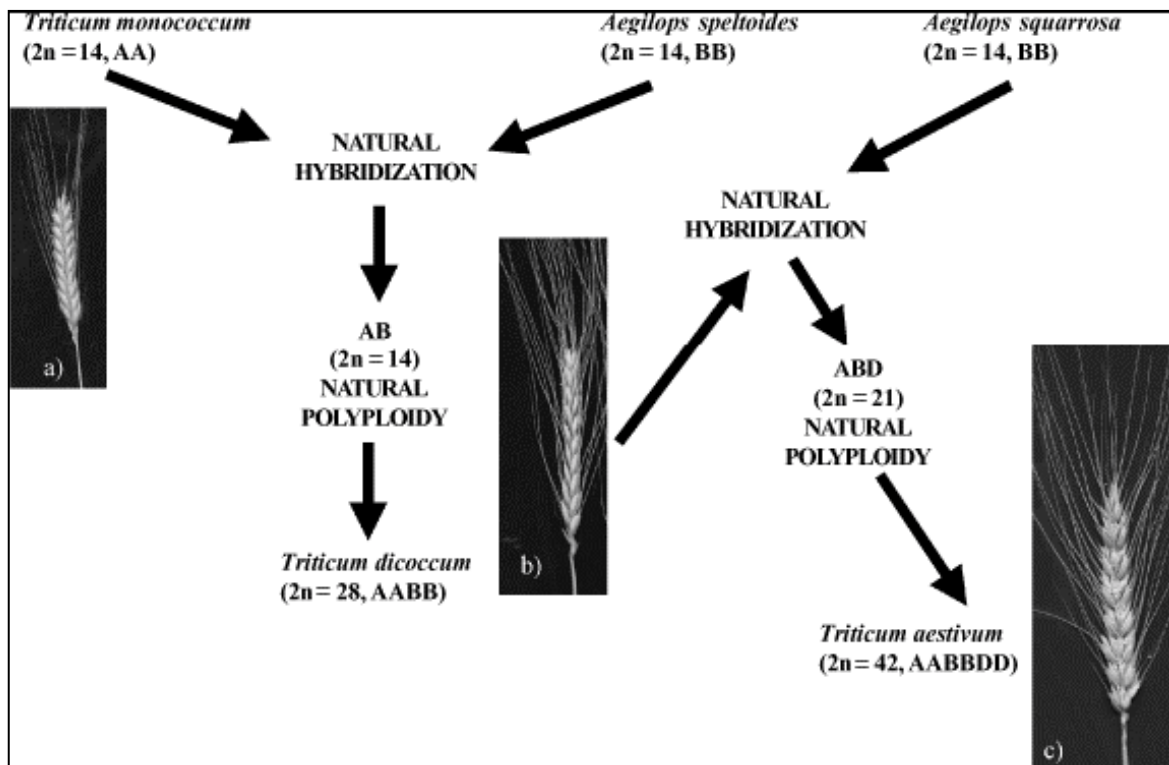


Рис.1.1. Еволюційний шлях пшениці м'якої *T. aestivum* [19].

Протягом останнього десятиліття розвиток генетичної інженерії розширив можливості традиційної селекції [27]. Отримання рослин з новими ознаками та властивостями, стійких до хвороб, шкідників (бактерій, грибів, комах, нематод, вірусів), з покращеними агрономічними показниками, тощо стало можливим через застосування біотехнологічних методів. До таких методів, зокрема, належить генетична трансформація, яку можна здійснювати за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* *in vitro* чи *in planta* (опосередковане перенесення генів) та біолістичної трансформації (пряме перенесення генів).

Спершу всі спроби трансформації клітинних чи суспензійних культур за допомогою агробактерій були невдалими. Однак, згодом деяким групам вчених вдалося добитися позитивних результатів [28].

Першу успішну *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проведено у дводольних на початку 1980-х років. Був запропонований метод злиття протопластів із сферопластами агробактерій [29-30]. Не дивлячись на те, що даний метод не знайшов широкого застосування, з його допомогою були отримані трансформовані клітинні лінії рису, які синтезували опіни [31]. Пізніше був розроблений порівняно простий та зручний метод «листових дисків» [32]. Даний метод полягає у тому, що із листка нарізають смужки чи диски, інфікують бактеріями та спільно культивують протягом доби. Потім сегменти листків підсушують за допомогою фільтрувального паперу та поміщають на культуральне середовище, яке містить антибіотики для елімінації бактеріальних клітин та селективний агент. Метод «листових дисків» з різними модифікаціями, які полягають в зміні умов культивування рослинних експлантів з агробактеріями, оптимізації живильних середовищ та інших важливих деталей широко застосовується для генетичної трансформації різних видів рослин і до сьогодні [28].

Однодольні рослини, зокрема злаки, раніше вважалися стійкими до *Agrobacterium*-опосередкованого переносу генів, проте останнім часом з'являється все більше повідомлень про успішне отримання біотехнологічних злакових рослин: рису, кукурудзи, пшениці. Використовуючи незрілі та зрілі зародки, ембріогенний калюс, апікальні меристеми в якості первинних експлантів шляхом трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, отримано фертильні трансгенні рослини *T. aestivum* (ефективність трансформації становила 0,1-4%) [24, 33-34].

Незрілі та зрілі зародки часто використовують як експланти під час *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації, однак використання перших обмежене сезонною доступністю протягом року у великій кількості. Більш зручними є апікальні меристеми, клітини яких характеризуються високою мітотичною активністю, та отриманий з них калюс. Такі експланти доступні протягом року у великих кількостях [33, 35-36].

На сьогодні проблема зниження врожайності сільськогосподарських культур через конкуренцію з бур'янами за доступні поживні речовини, енергію та світло на сьогоднішній день є доволі актуальною. Довгострокове використання гербіцидів дало можливість найбільш шкідливим бур'янам розвинути резистентність. Завдяки цьому вони стали більш конкурентноздатними. За попередніми підрахунками світові втрати врожаю пшениці через бур'яни становлять 12,3%. Вирішення даної проблеми ґрунтується на вирощуванні рослин, які б містили гени інактивації гербіцидів або толерантності до них (Roundup®, Basta, Vialaphos, Herbiace, Glufosinate, тощо) [19, 37]. Окрім цього, значне зниження продуктивності м'якої пшениці викликають різні патогенні мікроорганізми [38-39]. Тому одним із завдань сучасної біотехнології рослин є створення високопродуктивних ліній *T. aestivum*, стійких до різного роду патогенів, гербіцидів, тощо.

## **1.2. Особливості морфогенезу м'якої пшениці *Triticum aestivum* в культурі *in vitro***

### **1.2.1. Отримання калюсної культури *Triticum aestivum* в умовах *in vitro***

Сучасні біотехнологічні методи відіграють важливу роль у створенні сільськогосподарських культур із цінними ознаками, а також у поліпшенні їхніх агрономічних характеристик. Протягом тривалого часу (близько 30 років) культури рослинних клітин і тканин *in vitro* викликають значний інтерес. З їх допомогою здійснюється вивчення фізіологічних і генетичних процесів [40].

Основним методом, який використовується у біотехнології рослин, є культивування ізольованих клітин, тканин та органів. Розробка основ методу розпочалася ще на початку ХХ століття. У 1902 р. Haberlandt вперше застосував його для роботи з клітинами палисадної паренхіми. В Україні культуру ізольованих коренів широко використовував М. Г. Холодний ще в 1915 році. У 30-ті роки ХІХ століття праці американського вченого White та

французького вченого Gotra зумовили розробку сучасного методу культури калюсних тканин.

Однак до теперішнього часу однозначного визначення калюсу немає. За Dodds і Roberts [41], калюс – це неорганізована меристематична або пухлиноподібна маса рослинних клітин, що формується *in vitro*. Terzi і Sung [42] визначають калюс як довільно проліферуючу тканину. У деяких роботах калюсом названа тканина, що виникає шляхом неорганізованої проліферації клітин рослин.

Таким чином, калюс – тканина, що виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин органів рослин. Її можна отримати *in vitro* практично з будь-якої живої тканини шляхом дедиференціації. Утворення і ріст калюсу регулюються ауксинами і цитокінінами. За допомогою цих речовин можна індукувати утворення калюсу в тих тканин рослини, які не утворюють його у відповідь на поранення.

Під час переходу із диференційованого стану до дедиференціації клітини експланту в першу чергу втрачають запасні речовини – ліпіди, крохмаль, білки. Також відбуваються біохімічні і цитологічні зміни: у фотосинтезуючих клітинах хлоропласт втрачає хлорофіл і ліпіди, зростає кількість амілопластів, руйнується апарат Гольджі, перебудови зазнають ендоплазматичний ретикулум та елементи цитоскелету, збільшуються розміри і кількість ядерця [43-44].

Перехід клітини *in vitro* із диференційованого стану до дедиференціації й активних клітинних поділів обумовлений зміною активності генів, які властиві для калюсних клітин. Активування одних генів і репресія інших призводить до зміни білкового складу клітин. У калюсних клітинах з'являються специфічні білки і водночас зникають або зменшується кількість білків, які характерні для фотосинтезуючих клітин листка. Здатність тканин і клітин за певних умов давати початок цілій рослині дозволяє здійснювати перехід із клітинного рівня на організменний і навпаки.

Вперше калюс отримав R. Gotra у 1938 році. Ця калюсна культура підтримується в умовах *in vitro* до цього часу.

В сучасних умовах калюсні культури індукуються практично з будь-якого органу і тканини рослин (листіків, стебел, коренів, квітконосів, частин квітки) і навіть таких спеціалізованих тканин рослин, як ендосперм насіння або ізольовані мікроспори пиляків. Однак, даний процес залежить від виду рослини і тканини.

Калюсна тканина *in vitro*, в основному, буває білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого кольору. Дуже рідко вона може мати інтенсивне зелене або фіолетове чи червонувате забарвлення, що залежить від виду рослин, типу експлантат та умов культивування. Темно-коричневе забарвлення часто виникає під час старіння калюсних клітин і пов'язане з накопиченням в них окислених фенольних сполук (хінонів).

Культура тканин *in vitro* дводольних рослин значно простіша та зручніша для проведення біотехнологічних маніпуляцій у порівнянні з культурою тканин однодольних. Впродовж багатьох років підбиралися і продовжують підбиратись умови для успішного культивування калюсної тканини, морфогенезу та подальшої регенерації у злаків.

У 1949 році La Rue вперше отримав калюсну культуру кукурудзи з ендосперму [45]; Gamborg у 1968 році показана можливість одержання суспензійної культури [46], а Shimada із колегами повідомили про формування калюсу та культури поодиноких клітин у пшениці [47-48].

Одержання морфогенного калюсу пшениці і наступна регенерація рослин – невід'ємна частина біотехнології цієї культури, оскільки на противагу дводольним, калюсогенез і регенерація злакових культур утруднені.

### **1.2.2. Вплив біологічно активних речовин на утворення калюсу**

Індукція калюсогенезу та подальшої регенерації у пшениці залежить від ряду факторів, а саме: генотипу, типу експланта, походження і

фізіологічного стану рослин-донорів, живильного середовища, температурного та світлового режимів, а також від взаємодії між ними [49-51]. Отримання калюсу перебуває у прямій залежності від підбору оптимальних концентрацій основних груп фітогормонів у культуральному середовищі. Зазвичай ауксини використовують як стимулятори калюсогенезу [48, 52]. Провідну роль у регенерації пагонів із калюсу відіграють цитокініни, але даний процес також неможливий без участі ауксинів [53]. Взаємодія між ауксинами і цитокінінами може бути синергічною, антагонічною або аддитивною і залежить від типу тканини та виду рослин. Молекулярні механізми, що лежать в основі більшості ауксин-цитокінінових взаємодій на даний час залишаються невивченими. Вважається, що гормональна взаємодія здійснюється через контроль метаболізму (синтез, розпад, запасання тощо) даних груп фітогормонів у рослині. За своєю природою ці біологічно активні речовини є подразниками, тому природа викликаного ними процесу залежить від стану диференціації клітини, тобто від набору активних, здатних або нездатних до активації/експресії генів [54]. Важливим в ініціації морфогенетичних процесів у культурі рослин *in vitro* є поєднання регуляторів росту в оптимальних концентраціях [55-58].

Для індукції калюсу у злакових застосовують 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту) або ІОК ( $\beta$ -індолилоцтову кислоту), а також піклорам і дікамбу – у випадку ячменю [59-60] та кукурудзи [61]. Високий вміст 2,4-Д у культуральному середовищі викликає соматоклональну мінливість у зернових культур. Тому при розробці протоколів успішного калюсогенезу та регенерації використовують незначну кількість даного ауксину. Вважається, що для індукції калюсоутворення оптимальне співвідношення ауксинів до цитокінінів у живильному середовищі повинно складати 10:1. Подальше культивування калюсу злаків вимагає високого вмісту ауксинів, найчастіше (до 10 мг/л). ІОК має меншу активність, ніж її синтетичний аналог (2,4-Д), тому її використовують у вищій концентрації (100 мг/л).

Внесення незначної кількості органічних речовин, таких як вітаміни, амінокислоти та аналоги ауксинів може підвищувати частоту утворення морфогенного калюсу [61].

Ріст і розвиток культивованих клітини і тканин рослин залежить від взаємодії біологічних факторів, серед яких ключовим є живильне середовище та допоміжні компоненти. Прикладом таких речовин може бути мезоінозит, який є одним із стереоізомерів інозиту. Він класифікується як один із представників вітамінів групи В. Morel і Wetmore показали, що 100 мг/л мезоінозиту в поєднанні з іншими вітамінами може бути використано для отримання калюсу у представника однодольних – *Amorphophallus rivieri* [62].

В якості експлантів для отримання ембріогенного калюсу та регенерації рослин у пшениці найчастіше використовують зрілі і незрілі зародки [49], суцвіття, колеоптилі [63], апікальні меристеми [64], тощо. Більшість дослідників вважають незрілі зародки найбільш вдалим типом експлантів для регенерації *in vitro* у зернових культур [59, 65-66].

На процеси калюсогенезу *T. aestivum* впливає стадія розвитку незрілих зародків. Так, ранні стадії розвитку експланта (12-15 діб після цвітіння) забезпечують набагато вищу частоту утворення калюсу у порівнянні з пізніми (22-30 доба). Застосування високих концентрацій 2,4-Д у живильному середовищі під час культивування зародків, виділених на ранній стадії, не рекомендується, оскільки такі концентрації можуть пригнічувати морфогенетичні процеси. Висока концентрація даного ауксину є більш ефективною під час використання ембріонів, що характеризуються пізньою стадією розвитку [67].

### **1.2.3. Особливості морфогенезу у пшениці м'якої *Triticum aestivum***

Морфогенетичний потенціал рослинної клітини проявляється в системах *in vitro* у більш широкому діапазоні, ніж у природних умовах, завдяки еволюційно обумовленій здатності до регенерації. Порухення цілісності рослинної тканини – основна передумова ініціації регенераційних

програм. Вона досягається шляхом пошкодження різноманітними фізичними чинниками, насамперед, температурним впливом, тощо. В залежності від поєднання факторів, які визначають початкові умови, можливі різні морфогенетичні сценарії, що, в свою чергу, породжує труднощі у регуляції морфогенезу в системах *in vitro* [68-69].

Морфогенез – це складний, комплексний процес, регуляція якого здійснюється на клітинному, тканинному та організменному рівнях. Він залежить від зовнішніх і внутрішніх чинників, які мають кумулятивний ефект. Такі фактори визначають процеси поділу, розтягнення, диференціації, старіння та загибелі клітин. Численні дослідження присвячені вдосконаленню методик, які дають змогу реалізувати різні морфогенетичні шляхи, однак розроблені протоколи не завжди однаково ефективні і потребують оптимізації та врахування видових особливостей [69-70].

Основою всіх морфогенетичних процесів є тотипотентність – здатність однієї клітини розвиватися в цілий організм, володіння нею всіма потенціями майбутнього організму. Окрім цього тотипотентність передбачає збереження в рослинних клітинах повної базової структури ДНК індивідуума. Тотипотентність рослинних клітин не є чимось абсолютним, і продемонструвати її для деяких високоспеціалізованих клітин рослин надзвичайно важко. Тотипотентність меристематичних клітин реалізується в ході їх ділення, тоді як тотипотентність спеціалізованих клітин реалізується за допомогою дедиференціації з подальшою новою диференціацією. В основі де- і диференціації клітин лежать процеси, пов'язані зі зміною стану хроматину і диференціальної активності генів [41]. Кінцевим результатом таких процесів можуть бути різні способи і форми їх здійснення залежно від ступеня тотипотентності клітини. У калюсних культурах *in vitro* можлива реалізація всіх властивих рослині шляхів морфогенезу (органогенез за типами гомогенезу, ризогенезу, геморизогенезу, а також ембріодогенезу та гістогенезу) [71]. Реалізація органогенного потенціалу відбувається лише за

умови компетентності клітин експлантів, тобто здатності сприймати сигнали та відповідати на них шляхом утворення органів чи ембріонів [70, 72].

Розвиток клітин, що входять в морфогенні структури відбувається за наступним напрямком: диференціація → дедиференціація → диференціація. Кожен етап здійснюється через поділ клітин, однак не саме ділення, а зміни, що відбуваються всередині клітин у проміжках між поділами (зміни стану хроматину, що визначають стан диференціації клітини), визначають напрямок розвитку. Таким чином, ділення клітин і їх диференціація складають основу морфогенезу у рослин.

В сучасних умовах розвиток методів культивування рослинних клітин дозволяє за допомогою певних методичних підходів, регенерувати з калюсу цілу рослину. Швидкість регенерації рослин в культурі тканин *in vitro* варіює залежно від виду. Отримати цілий рослинний організм можна з різних клітин, тканин та органів. Однак, методи регенерації відрізняються між собою за ефективністю та підбираються для кожного виду та генотипу індивідуально [73].

Розробка методів успішної регенерації *in vitro* є одним із основних завдань біотехнології. Існує ряд факторів, які впливають на утворення морфогенного калюсу, а відтак і регулюють регенераційні процеси у рослин. Зазвичай ефективність методів регенерації залежить від генотипу [74], а також походження рослини-донора, стадії розвитку експланту та компонентів живильного середовища.

Перше повідомлення про можливість хімічної регуляції органогенезу *in vitro* було зроблено Skoog у 1944 році. Він виявив, що внесення ауксинів у живильне середовище стимулювало утворення коренів, але пригнічувало пагоноутворення [75]. Згодом було встановлено, що аденін сульфат стимулює ініціацію утворення пагонів і знімає інгібуючий ефект ауксину на даний процес. Таким чином сформувався гіпотеза, згідно якої можна ініціювати утворення стебел, коріння або недиференційоване розростання калюсу, змінюючи відносний вміст ауксинів і цитокінінів.

З метою стимулювання процесів морфогенезу до культуральних середовищ додають різні біологічно активні речовини — синтетичні аналоги фітогормонів. Однією з таких речовин є тидіазурон (ТДЗ), який характеризується значною ефективністю [36, 50]. ТДЗ (3-(1,2,3-тіадіазолін-5)-1-фенілсечовина), що використовується як гербіцид, є стимулятором росту, та ефективним регулятором морфогенезу *in vitro* у багатьох дводольних рослин. Показано, що тидіазурон характеризується більшою активністю ніж цитокініни і зеатин. Згідно сучасних уявлень він безпосередньо стимулює ріст через власну біологічну (цитокінінову) активність та здатний стимулювати синтез і накопичення ендогенних цитокінінів [50]. Відомо також, що відносно високі концентрації ТДЗ (до 10 мг/л) здатні індукувати утворення калюсу та стимулювати формування соматичних ембріодів [76].

Існує думка, що цитокініни не відіграють суттєвої ролі в соматичному ембріодогенезі більшості рослин. Цитокініни за хімічною будовою розділяють на аденіновий тип (кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин) і фенілсечовинний тип (ТДЗ). Для індукції утворення ембріогенного калюсу в багатьох випадках доцільно використовувати кінетин, БАП (6-бензиламінопурин) і бензиладенін (БА) [50]. Останній часто використовують на етапах проліферації соматичних зародків та їх регенерації в повноцінній рослині [50, 77-78].

Ініціація регенерації пагонів з культури тканин рослин *in vitro* може забезпечуватися шляхом застосування відповідних екзогенних регуляторів росту. У випадку однодольних відсутність ауксину у живильному середовищі може стимулювати утворення пагонів. У подальшому рекомендується субкультивування калюсу на безауксинових середовищах [41, 78]. Речовини, які мають цитокініноподібні властивості можуть замінити цитокініни під час регенерації. До таких речовин належать заміщені пурини, піримідини та сечовина. Прикладом може бути аденін сульфат, який можна застосовувати в якості цитокініну для індукції бруньок. Однак ауксин/цитокініновий баланс у

живильному середовищі або його відсутність, в окремих випадках, не покращує регенерацію для багатьох видів. Це пов'язано із:

- необхідністю використання екзогенних регуляторів росту;
- ендогенні фітогормони можуть накопичуватися у калюсній тканині і чинити інгібуючий вплив на органогенез;
- умови культивування, а також фізичні фактори можуть перешкоджати ініціації регенераційного процесу.

Інтенсивність органогенезу під час регенерації залежать від багатьох факторів, серед яких особливу роль відіграють генотип рослини (видоспецифічність), а також властивості органів і тканин [41, 79].

Висока частота регенерації *in vitro* пшениці *T. aestivum* є однією з найважливіших умов генетичної трансформації. Найчастіше для утворення пагонів використовують різноманітні співвідношення компонентів живильного середовища, зокрема фітогормонів. 2,4-Д є найбільш широко вживаним екзогенним регулятором росту для злакових, однак піклорам більшим позитивно впливає на індукцію морфогенетичних процесів [80-81].

За тривалого субкультивування відбуваються зміни і в середині калюсної культури, а саме: гормональне звикання, втрата органогенного потенціалу та зміни самої структури калюсної тканини, що негативно позначається на регенерації пагонів [41].

Рослинні гормони є природними речовинами, які за низької концентрації не лише контролюють різні етапи росту і розвитку рослин, а й відповідають за формування захисної реакції у відповідь на дію стресових факторів. Вважається, що за допомогою системи гормональної регуляції в клітинах рослин відбувається координація реакцій, які забезпечують стійкість до несприятливих зовнішніх чинників [52].

Аналізуючи клітинні і тканинні особливості початкового етапу морфогенезу *in vitro* в калюсах, більшість дослідників схиляються до думки, що морфогенез починається з формування груп меристематичних клітин, так званих «вогнищ морфогенезу» [71, 82]. Регенераційну здатність у злаків

також пов'язують з появою в калюсній тканині саме таких щільних ділянок [7, 50, 83]. Внесення у живильне середовище абсцизової кислоти (АБК) або саліцилової, у деяких випадках дозволяє збільшити їх кількість у калюсній тканині пшениці. Можливо причиною такого ефекту є накопичення АБК під час культивування калюсу. Присутність ІОК в культуральному середовищі має протилежний ефект – призводить до розрихлення калюсу [52, 84-85]. Torrey у 1966 році висунув гіпотезу про те, що органогенез у калюсній культурі розпочинається з формування кластерів меристематичних клітин, здатних реагувати на фактори, які стимулюють регенерацію. Ініціація ризо-, ембріодогенезу чи пагоноутворення залежить від природи таких стимулів [86]. Існує думка, що регенерація органів у культурі тканин тісно пов'язана з морфогенною активністю, яка передує утворенню пагонів і коренів. Однак, єдиної думки з приводу конкретного розташування морфогенних кластерів у калюсі немає. Можливо такі осередки формуються на поверхні калюсної тканини [71, 82, 87-88], або морфогенез починається в групах меристематичних клітин, які розташовані в товщі калюсу та інтенсивно діляться [89-91]. В калюсній тканині структурно-функціональний стан клітин визначається можливістю здійснювати за допомогою фізико-хімічних контактів вплив на інші. В основному, морфогенні зони розташовані поблизу місця контакту калюсу з живильним середовищем. Це відбувається тому, що градієнти речовин, дифундуючих з живильного середовища в калюс можуть відігравати значну роль у визначенні місця утворення меристемоїдів [41].

Експериментально доведено, що калюсні структури пшениці, які мають щільну компактну консистенцію, матовий жовтувато-білий колір і, як правило, вузлувату форму, найбільше здатні до морфогенезу, а в подальшому – до регенерації рослин [92].

Присутність у живильному середовищі нітрату срібла, нітрату амонію, деяких амінокислот (проліну, тирозину, серину), поліамінів (путресцину і спермідину), цукрів (маніту і сорбіту) стимулює морфогенез в калюсі.

Ризогенез є одним із типів органогенезу, який найчастіше зустрічається у культурі тканин *in vitro*, однак існує чітке розмежування між вкоріненням пагонів-регенератів та утворенням коренів у меристемоїдах калюсних культур. Найчастіше у тканинних культурах формуванню коренів сприяють ауксини, проте зустрічаються випадки, коли екзогенні ауксини виступають інгібіторами ризогенезу. Специфічність відповіді культури калюсу на дію ауксинів різної хімічної будови визначається відмінностями метаболізму цих речовин. Таким чином, ауксин/цитокініновий баланс є ключовим фактором щодо ініціації ризогенезу.

Інтенсивність ризогенезу може знижуватися після кількох субкультивувань калюсу. Причини такого явища на сьогодні достеменно невідомі. Існує думка, що зниження морфогенетичної активності відбувається через виснаження специфічного індуктора морфогенезу [41]. Іншим можливим поясненням такого явища є епігенетичні зміни, які відбуваються в культурі тканин [93].

Регенерація рослин – наріжний камінь всієї методології культури клітин і тканин. Без регенерації стають неможливими дослідження з гібридизації протопластів, отримання трансгенних рослин, промислового клонування з метою швидкого розмноження рослин, отримання безвірусного матеріалу за допомогою культури меристем тощо.

Таким чином, на сьогодні визначено фактори, які впливають на морфогенетичні процеси у рослин, досліджено участь біологічно активних речовин в регенераційних процесах, розроблено протоколи успішної регенерації для більшості видів. Не дивлячись на чималий успіх, досі залишаються не вирішеним чимало питань, серед яких закономірності утворення та розташування морфогенних осередків у калюсній культурі, встановлення причин зниження частоти ризогенезу після кількох субкультивувань, механізми взаємодії регуляторів росту між собою та рослинним організмом, тощо. Підвищення частоти регенерації під час

генетичної трансформації однодольних, зокрема злаків – одне з основних завдань сучасної біотехнології.

### **1.3. Експлант як ключовий фактор успішної біотехнології злаків**

Для індукції калюсогенезу та подальшої регенерації пшениці в якості вихідного матеріалу зазвичай використовують зрілі та незрілі зародки [33, 94-95], суцвіття [80, 96-97], мезокотелі та апікальні меристеми [81, 98]. Незрілі зародки м'якої і твердої пшениці володіють найбільшим регенераційним потенціалом [70, 80-81, 95]. Однак показано, що частота регенерації деяких генотипів твердої пшениці може бути набагато вищою за використання зрілих зародків [99].

Під час культивування експлантів *in vitro* важливе значення мають вік, їх онтогенетичний та фізіологічний стан, ступінь диференціації, а також розташування на живильному середовищі. У більшості тканинних культур розміщення експланту на культуральному середовищі визначається його фізіологічною полярністю [7, 70].

Незрілі зародки, через їх ювенільну природу, давно розглядаються як найбільш вдалий тип експлантів для отримання регенерантів таких видів рослин, як злаки, бавовна, сосна тощо. Незрілі зародки пшениці, а також калюс, одержаний з них, вважаються найкращими експлантами для біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації. Проте їх використання обмежене сезонністю отримання, а також труднощами підбору оптимальної стадії розвитку. Схильність до некрозу після ко-культивування – одна з перешкод у використанні даного типу експлантів під час трансформації за допомогою агробактерій. Показано, що некротування виникає через швидке утворення пероксиду гідрогену ( $H_2O_2$ ) в культурі незрілих зародків пшениці під час контакту з *Agrobacterium*, знижуючи, таким чином, ефективність трансформації [73, 100-102]. З метою послаблення негативного ефекту  $H_2O_2$  доцільно використовувати антиоксиданти, такі як: аскорбінова кислота, цистеїн та нітрат срібла [102-103].

Зрілі зародки, в якості вихідного матеріалу, є більш зручними, оскільки їх застосування передбачає зниження вартості та економію часу. Саме через високу регенераційну здатність даних експлантів рис став модельним видом для прикладної біотехнології та генетичної інженерії зернових культур. Використовуючи ефективні протоколи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та зрілі зародки, на сьогодні отримано морфогенні лінії калюсу рису, які в подальшому успішно регенерують [70, 104-106]. Крім того, даний тип (зрілі зародки) експлантів характеризується мінімальною фізіологічною мінливістю, тим самим спрощуючи використання зрілих зародків у біотехнологічному процесі.

У 1984 році вперше, використовуючи зрілі зародки в якості вихідного матеріалу, вдалося отримати регенеранти пшениці [107]. Показано, що частота утворення первинного калюсу з даного типу експлантів, в середньому, становить 80-90 %. Попри це, регенерація пагонів залишається дещо нижчою, ніж у випадку використання незрілих ембріонів (82%) [108-109]. Для індукції калюсогенезу використовують зрілі зародки, тонкі зрізи частини зародка або зародки з частиною ендосперму. Особливість використання зрілих зародків під час генетичної трансформації полягає у тому, що меристеми покриті листковими зачатками, тому для кращого проникнення ДНК потрібно додаткове пошкодження тканин [73, 110].

Листкові сегменти та апекси пагонів злакових культур набувають все більшої популярності як експланти для генетичних маніпуляцій [36, 111]. Ці експланти за короткий час продукують значну кількість вихідного матеріалу (калюсу), що важливо для рослин з генотипово обумовленою низькою регенераційною активністю [64, 66, 111]. Показано, що процеси калюсогенезу в культурі листкових експлантів пшениці не залежать від генотипу. На ефективність дедиференціації та диференціації клітин, в основному, впливають вік експланта, його розміри та положення на пагоні, а також склад живильного середовища. Встановлено, що найвищою здатністю до утворення калюсу і регенерації пагонів характеризується базальний

сегмент листка. У випадку інших сегментів частота морфогенезу помітно знижується. Таке явище спостерігається і в інших представників злаків [7, 83, 111].

Останнім часом найбільш перспективним типом експлантів злакових культур вважаються апікальні меристеми. Їх перевага над іншими експлантами полягає у доступності протягом року в достатній кількості та високому регенераційному потенціалі. Розробляється ефективна та генотип незалежна система регенерації з меристем кукурудзи, ячменю, вівса тощо [36, 64, 110-113]. Такий вибір вихідного матеріалу зумовлено наявністю в апікальних сегментах пагонів груп клітин (ініціальних і субепідермальних), що активно діляться та характеризуються високою здатністю до калюсогенезу. Утворений з них калюс поділяється на два типи: перший – морфогенний – щільний, жовтуватий, глобулярний, який під час перенесення на середовище для регенерації здатний утворювати регенеранти; другий – неморфогенний – пухкий, водянистий і прозорий [111].

Апікальні меристеми пагона мають низку унікальних особливостей, які роблять їх зручним вихідним матеріалом для маніпуляцій з культурою тканин. Мітотична активність *in vitro* апексів пагона може зберігатися доволі довго в диференційованих тканинах. Показано, що після пошкодження апікальних меристем можуть відновлювати цілий меристематичну ділянку [113]. Завдяки таким особливостям меристем пагона стало можливим їх культивування *in vitro* і дослідження морфогенетичних процесів у зернових культур.

Апікальні меристеми у дводольних мають складну будову, вони складаються з трьох шарів клітин: 1-й та 2-й шар – туніка, 3-й – корпус. В зоні туніки поділ клітин відбувається в основному перпендикулярно до поверхні. Корпус – шар клітин в центральній частині меристеми, де на відмінну від туніки клітинні поділи відбуваються у всіх площинах. Однодольні мають лише два шари: один шар туніки та корпус. Другий шар є особливо важливим для стабільної генетичної трансформації, оскільки саме з

нього в подальшому будуть розвиватися репродуктивні органи, через які відбуватиметься передача генетичного матеріалу наступним поколінням. Меристематичні клітини апексу зазвичай мають великі ядра та вакуолі. Саме ці клітини визначають структуру і функції апікальної меристеми пагона [114-115].

Використання апікальних меристем дозволило розробляти ефективні системи регенерації, що є основою для генетичної трансформації злакових. Частота регенерації з культури калюсу пшениці апікального походження може задовольнити потреби сучасної біотехнології даної культури [110-111, 116].

На калюсогенез і регенерацію будь-якого типу експланта, впливають з одного боку генотип вихідної рослини, а з іншого – склад живильного середовища. Встановлено, що підвищення частоти утворення пагонів спостерігалось під час використання експлантів, відібраних за оптимальної стадії розвитку та контрольованих умов навколишнього середовища [102, 108]. Також для успішного утворення калюсу та регенерації з різних типів експлантів слід враховувати не лише генотипові особливості, а й епігенетичні характеристики вихідного матеріалу.

Розглядаючи питання експланта як ключового фактора біотехнології, а також основної ланки регенераційних протоколів будь-якого виду рослин, не лише злаків, слід враховувати ряд особливостей, зокрема:

- для кожного виду необхідно підбирати співвідношення компонентів живильного середовища, яке б забезпечувало високу частоту як калюсогенезу, так і утворення пагонів;
- враховувати стадію розвитку експланта;
- підбирати експлант, який характеризується високою мітотичною активністю та може зберігати її доволі довго в диференційованих тканинах.

На сьогодні залишається актуальним питання надійності вибраного експланта, отримання з нього калюсу, який характеризувався б високою

морфогенною активністю, а відтак і регенерацією протягом тривалого часу [111].

#### **1.4. Біотехнологічні методи перенесення чужорідної ДНК в рослинний організм**

Протягом тривалого часу існувало твердження, що меристематичні клітини зернових культур не піддаються генетичній трансформації. Проте, численні дослідження стабільної експресії та успадкування маркерного гена кукурудзи *zeine* шляхом бомбардування меристематичних тканин як первинних експлантів, показали, що деякі зернові культури можуть бути генетично модифіковані [110, 117]. За молекулярними та гістохімічними даними ефективність генетичної трансформації меристем кукурудзи знаходиться на такому ж рівні, як незрілих зародків та отриманого з них калюсу. Висока компетентність меристем пагона кукурудзи забезпечила 100% частоту котрансформації двох зчеплених генів (*bar* та *pin2*) та 80% – для незчеплених (*bar* і *gus*). Крім того, відтворюваність незалежних *bar*-трансформаційних подій у кукурудзи була значно вищою, ніж у дводольних, отриманих шляхом біолістичної трансформації [110, 118-119].

Генетичну трансформацію рослин можна здійснювати багатьма методами, найбільш поширеними з яких є трансформація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes in vitro* (опосередкований перенос генів) та біолістична трансформація (прямий перенос генів) [17, 120]. Також застосовують метод електропорації [121] та поліетиленгліколь-опосередковане перенесення генів [122]. В останні роки все більшої популярності набуває метод генетичної трансформації рослин *in planta* за допомогою агробактерій. Цей метод стає все більш конкурентоздатним по відношенню до «класичних» методів.

З метою ідентифікації трансформованих і нетрансформованих рослин в генетичній конструкції поряд із геном інтересу розташовується додатковий маркерний ген. Виділяють дві групи таких генів: репортерні, які кодують

нехарактерні для даного виду білки, що легко виявляються, та селективні – надають стійкості до антибіотиків, гербіцидів тощо. За наявності селективних генів трансформовані рослини, на відміну від звичайних, мають можливість вижити на селективному середовищі. В якості репортерних найчастіше використовують гени зеленого та жовтого флюорисцентних білків (*gfp*, *yfp*), β-глюкуронідази (*gus*, *uidA*), люциферази (*luc*) та ін. Значна частина досліджень в галузі генетичної трансформації з використанням *Agrobacterium* спрямована, в основному, на підвищення її ефективності, з'ясування механізмів та розширення кола видів, до яких може застосовуватись [111].

#### **1.4.1. Отримання біотехнологічних рослин шляхом *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів**

Спосіб введення чужорідної ДНК за допомогою агробактерій базується на використанні природних векторів, таких як Ti-плазміда *A. tumefaciens* і Ri-плазміда *A. rhizogene* та має суттєві переваги над іншими методами генетичної трансформації рослин. Його застосування дозволяє використовувати генетичні конструкції відносно великого розміру та призводить до мінімальних порушень у кодуючих послідовностях генів, що переносяться [33, 123].

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин – досить складний і тривалий процес, який передбачає участь, як бактеріальних генетичних детермінант, так і клітин рослини-господаря. До перших відносять: T-ДНК, яка переноситься в рослинну клітину; область вірулентності (регіон *vir*), що є головним «вмикачем» трансформації; три хромосомні локуси вірулентності бактерій, які необхідні для процесу передачі (*chvA*, *chvB* та *pscA*) [124]. Область T-ДНК оточена крайовими повторами у 25 п.н., між ними вбудовують ген інтересу та маркерний ген. Область *vir* включає вісім оперонів (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* та *virH*), які кодують білки для процесингу та передачі T-ДНК. Пошкоджені рослинні клітини виділяють низькомолекулярні сполуки (ацетосирінгон) –

сигнальні речовини для *Agrobacterium*, які індукують експресію області *vir i*, тим самим, активують передачу Т-ДНК. Перенесення генів з *Agrobacterium* у рослинні клітини включає п'ять основних етапів: індукцію системи вірулентності бактерій, утворення Т-ДНК комплексу, передачу Т-ДНК у ядро клітини-господаря, інтеграцію Т-ДНК в геном рослини та експресію генів Т-ДНК [16, 125-126]. Область Т-ДНК разом із трансгеном, може стабільно інтегруватися в геном рослини, використовуючи один із механізмів: інтеграція одноланцюгової ДНК на основі мікрогомології, або інтеграція дволанцюгової ДНК у подвійні розриви ДНК [127].

Раніше вважалося, що однодольні рослини, у тому числі і важливі зернові культури, є стійкими до *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів. Це пов'язано з тим, що такі рослини не виділяють із пораних тканин ацетосирінгон – специфічну фенольну сполуку, яка активує гени вірулентності Ті-плазмиди у агробактерій. Дана проблема вирішується шляхом додавання ацетосирінгону в середовище для спільного культивування рослинних клітин і бактерій [111]. На сьогодні розроблені ефективні протоколи агробактеріальної трансформації кукурудзи [12, 128], рису [103], пшениці [129-130].

Розробка ефективних протоколів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації – складне завдання, яке вимагає розуміння впливу всіх чинників на перенесення Т-ДНК у клітини, з яких в подальшому буде регеноеровано цілий рослинний організм.

На регуляцію передачі Т-ДНК та її інтеграції в геном рослини впливають різні фактори, основними з яких є генотип рослини, тип експлантів, бактеріальний штам, плазмідний вектор, склад живильного середовища, температура і час ко-культивування експлантів та бактеріальних клітин, наявність поверхнево-активних речовин (ПАР), елімінація бактеріальних клітин шляхом застосування антибіотиків [111, 131-132]. Результати ряду досліджень дають підстави стверджувати, що частота трансформації пов'язана з оптичною щільністю агробактеріальної суспензії,

часом перебування експлантів в ній. Ефективність трансформації може варіювати в залежності від типу селективного маркера, а відтак і від концентрації селективного агента в культуральному середовищі [133].

Взаємодія між *Agrobacterium* і рослиною здійснюється через ряд сигналів, що дозволяють встановити зв'язок між патогеном і господарем, а саме: нейтральні і кислі цукри, фенольні сполуки, опіни, білки вірулентності [134-135]. Агробактерії успішно застосовують для трансформації злакових, які не є природними господарями агробактерій. Для отримання біотехнологічних рослин пшениці в основному використовують три штами *Agrobacterium*: LBA4404, C58C1 та AGL1 [136-138]. Частота застосування штаму LBA4404 становить 44 %, C58C1 та AGL1 – 24%, інших (A281, ABI, GV3101, EHA101, AGL0, M-21 та ін.) – менше 10% [111] (табл.1.1). Лише деякі генотипи *T. aestivum* (наприклад, Bobwhite) можна трансформувати загальнозживаними штамми (LBA4404) [94, 111, 139]. Вирішити дану проблему вдалося шляхом збільшення вірулентності за рахунок залучення додаткової бінарної плазмиди з *vir* генами [140]. Штами *Agrobacterium*, які зазвичай використовують для трансформації пшениці (LBA4404, C58C1) містять плазмиди з додатковими генами вірулентності (*vir* B, C, G) і відносяться до гіпервірулентної групи. Для кожного генотипу злакових проводять індивідуальний підбір штамів *Agrobacterium* та векторів. Ко-трансформація векторів є дуже важливою для процесу трансформації. Наприклад, для кукурудзи були запропоновані супер-бінарні вектори pSB131 і pТОК233, які містились у штамі LBA4404 [141]. За літературними даними штамми EHA105 та EHA101 виявилися більш ефективними для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи та пшениці, оскільки саме за їх використання спостерігалася найвища частота отримання трансгенних рослин [11, 142].

Тривалість спільного культивування експлантів з *Agrobacterium* може варіюватися від 1 до 5 днів, але в більшості випадків становить 48-72 год. Збільшення часу ко-культивування (більше 5 днів) може призводити до

надмірного розвитку агробактерій, пригнічення регенерації трансформантів і подальшої загибелі експлантів [109, 143-144]. Ефективність трансформації рослин також залежить від щільності суспензії агробактерій. Спостерігається чітка позитивна кореляція між щільністю *Agrobacterium* і збільшенням транз'єнтної експресії в діапазоні від  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  утворених колоній на мл середовища. Проте, така закономірність не завжди справджується для стабільної трансформації. Збільшення щільності бактеріальних клітин призводить до зниження відновлювального потенціалу клітин рослини, що, в кінцевому рахунку, зменшує ефективність стабільної трансформації [16]. Встановлено, що найвища частота отримання трансформантів (84 %) у цукрової тростини спостерігається за оптичної щільності бактеріальної суспензії 0,2. У той час, як при  $OD_{600}=0,6$ , спостерігається некроз калюсної тканини. В однодольних, зокрема пшениці, максимальна ефективність трансформації була досягнута при  $OD_{600}=0,5-1,0$  [108, 144-145]. Однак Ке та Атоаh показали можливість отримання трансформантів за  $OD_{600}=1,5-2$  [147-148].

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації залежить від складу живильного середовища: концентрації солей, вуглеводів, регуляторів росту, тощо. Середовище МС [149] найбільш часто використовується для культивування дводольних і деяких видів однодольних рослин, проте окремі види вимагають особливого складу живильного середовища для забезпечення оптимальних умов трансформації. Для підвищення ефективності генетичної трансформації доцільно використовувати хімічні речовини, подібні до ацетосирінгону, оскільки вони імітують природні фенольні сполуки, які разом із цукрами та кислим рН індують вірулентність у *Agrobacterium*. Було показано, що інші хімічні компоненти, наприклад антиоксиданти, також впливають на ефективність трансформації та регенерації в деяких видах рослин. Внесення у живильне середовище для спільного культивування тіолових сполук, таких як дітіотреїтол, тіосульфат натрію і L-цистеїну підвищує частоту отримання

трансгенних рослин сої [150]. Присутність аскорбінової кислоти, цистеїну та нітрату срібла в живильному середовищі підвищує стабільну трансформацію у кукурудзи, рису, сої, цукрової тростини та пшениці [9, 12, 16, 103, 151-152]. В арабідобсису і тютюну збільшення числа отриманих трансгенних рослин-регенерантів відбувається через підвищення концентрації нітрату амонію в регенераційному середовищі. Крім того, хлорид калію і солі рідкоземельних металів церію і лантану поліпшують ріст рослин і збільшують частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації у тютюну та арабідопсісу [153].

Поверхнево-активні речовини, такі як Silwet L77, Tween 20 і плуронік F68 сприяють перенесенню T-ДНК: за їх участі *Agrobacterium* ефективніше прикріплюються до рослинних клітин.

Під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації важливим є усунення бактеріальної контамінації шляхом застосування різних антибіотиків (цефотаксим, карбеніцилін, тиментин, тощо). Дані речовини сприяють підвищенню ефективності даного процесу, оскільки зменшують негативну дію, яку чинять агробактерії в культурі тканин *in vitro*. Однак, в деяких випадках антибіотики можуть негативно впливати на морфогенетичні процеси у рослин, знижуючи таким чином ефективність отримання трансгенних рослин [128]. Крім того, внесення у живильне середовище антибіотиків під час диференціації та вкорінення може підвищити частоту появи трансформантів у деяких рослин, хоча можливий і протилежний ефект [11, 154-155]. Ефективність антибіотика залежить від інших параметрів, зокрема складу живильного середовища [12, 156].

Фізичні фактори, такі як температура, відіграють важливу роль в процесі генетичної трансформації рослин. Встановлено, що оптимальним температурним режимом під час спільного культивування у випадку дводольних є 19-20 °С, у той час, як в однодольних вона становить 24-25 °С, а в деяких випадках – 28 °С [103, 157-158]. Kondo та співавтори досліджували вплив чотирьох температурних режимів, а саме 18, 20, 22 і

24 °C на перенесення T-ДНК у калюсну культуру часнику. Найбільша частота транз'єнтної GUS-експресії спостерігалася при 22 °C (64%). Встановлено, що оптимальними для транз'єнтної та стабільної трансформації у пшениці є 23-25 °C і приблизно 23 °C – для кукурудзи. При визначенні оптимальної температури для стабільної трансформації необхідно враховувати тип експланта та штам *Agrobacterium* [159-161].

Для розробки ефективного протоколу генетичної трансформації не достатньо оптимізувати лише один із її параметрів. Відносний баланс всіх вище вказаних факторів може забезпечити високу частоту отримання трансформантів [12].

Регенерація *in vitro* є одним із основних факторів під час розробки ефективних протоколів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. В основному вона залежить від регуляторів росту. Однак, немаловажним для даного процесу залишається генотип вихідного матеріалу. Найбільша ефективність трансформації порівняно з іншими сортами показана у сорту Bobwhite, який володіє високою регенераційною здатністю. Завдяки цьому даний сорт ярої пшениці став «модельним генотипом» для агробактеріальної трансформації [111, 162]. У генноінженерних роботах також використовують наступні сорти: Chinese [163], Baldus [147], Florida, Cadenza [164] та ін.

Передумовою для успішної генетичної трансформації пшениці є здатність тканин-мішеней інтегрувати молекули ДНК в ядерний геном з подальшою регенерацією фертильних рослин з тканинної культури. На даний час проводиться робота стосовно підбору та вдосконалення умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, які б забезпечували підвищення її ефективності. Встановлено, що підсушування клітин під час спільного культивування з *Agrobacterium* може покращити доставку T-ДНК і сприяти стабільній трансформації. Завдяки цьому відбувається пригнічення росту клітин *A. tumefaciens*. Молекулярні механізми даного процесу досі залишаються невідомими. Експериментально показано, що 10-15 хв.

повітряної обробки калюсної культури підвищує ефективність трансформації в 10 разів і більше у порівнянні з контролем [33, 144, 151, 165].

Загалом системи генетичної трансформації рослин повинні відповідати таким вимогам:

- забезпечувати стабільну інтеграцію чужорідної ДНК у геном господаря без структурних ушкоджень принесеної ДНК;
- забезпечити стабільність нового генотипу впродовж багатьох генерацій;
- в ідеалі, забезпечити тканино-специфічну регуляцію та онтогенез-специфічну регуляцію перенесеного гена.

Протоколи агробактеріальної трансформації рослин *in vitro* вперше були розроблені для модельних видів рослин: *Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata*, *Nicotiana tabacum* та *N. benthamiana*. Протягом останніх десятиліть число видів, які можна трансформувати за допомогою *Agrobacterium* значно зросло. За допомогою даного методу стало можливим отримання рослин з рекомбінантними антитілами, а також «їстівні вакцини» [166]. З метою виявлення присутності токсичних сполук у навколишньому середовищі, а також для детоксикації забруднених ґрунтів шляхом генетичної трансформації одержано рослини-біомонітори. Так, наприклад, трансгенні рослини *Arabidopsis thaliana* здатні вбирати та накопичувати арсен (As) із ґрунтових вод, або метиленоцистеїн з ґрунтів, багатих на селен, а також характеризуються толерантністю до важких металів, таких як кадмій і свинець [167-168]. Поряд із цим, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація дозволила значно поліпшити врожайність та продовольчі характеристики сільськогосподарських рослин. Були отримані рослини з підвищеною толерантністю до біотичних і абіотичних стресів, стійкістю до шкідників, тощо [16].

На сьогодні досліджено участь бактеріальних детермінант та клітин рослини-господаря, а також їх взаємодію під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації; визначені фактори, які впливають на даний

процес. Розроблені ефективні протоколи трансформації для більшості видів рослин. Однак, питання отримання трансгенних рослин злакових культур, зокрема пшениці, залишається доволі актуальним. Для вирішення цього питання необхідний аналіз та розуміння всіх факторів, які впливають на процес трансформації. Однією із перешкод для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці є обмежене число генотипів, здатних сприймати агроінфекцію, а також вірулентних штамів *A. tumefaciens*. Тому вдосконалення протоколів трансформації повинно бути спрямоване на розширення їх числа. Окрім цього, необхідно підібрати антибіотик, який ефективно усуватиме бактеріальні клітини та не пригнічуватиме регенерацію з культури калюсу. Як відомо, ефективність отримання біотехнологічних рослин може варіювати в залежності від концентрації селективного агента в живильному середовищі. Отримання безмаркерних форм може бути перспективним напрямком в генетичній трансформації рослин.

Таблиця 1.1.

Узагальнені дані *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці

Сорт	Тип експлантів	Штам <i>A. tumefaciens</i>	Гени, які переносили	Частота трансформації	Посилання
1	2	3	4	5	6
<i>In vitro</i>					
<i>Triticum aestivum</i>					
Bobwhite	Незрілі зародки	AGL1	<i>bar uidA</i> модифікований	0,3–3,3%	[164]
Canon					
Florida					
Cadenza					
Bobwhite	Незрілі зародки; ембріогенний калюс	C58 (ABI)	<i>bar nptII</i>	1,4–4,3 %	[139]
Bobwhite	Незрілі зародки	ABI	<i>gus nptII</i>	4,8–19%	[151]
Fielder	Незрілі зародки	AGL0	<i>gfp bar</i>	1,8%	[169]
Veery-5	Ембріогенний калюс	LBA4404	<i>gus bar</i>	1,2–3,9%	[140]
Stewart	Незрілі зародки	AGL1	<i>gus bar</i>	2,8–6,3%	[162]
Inqilab-91	Зрілі зародки	EHA101	<i>gus hpt</i>	4,07–15,62%	[146]
Kontesa	Незрілі зародки	EHA101	<i>nptII bar</i>	3,58%	[142]
Torka				3,14%	
Kontesa	Незрілі зародки	EHA101 AGL1 LBA4404	<i>hpt nptII</i>	1–12,6%	[66]
Eta					
Torka					
Bobwhite	Незрілі зародки	CP4	<i>epsps</i>	4,4%	[94]
HD2329	Зрілі зародки; калюс	LBA4404	<i>pin2 bar</i>	1,28–1,77%	[170]
CPAN1676					
PBW343					
PF 020037	Незрілі зародки	AGL1	<i>bar uidA</i>		[171]
BR 18 Terena					
Turbo	Колоски	C58C1	<i>nptII</i>	1–2,6%	[172]
Nongda146	Незрілі зародки	AGL1	<i>gus bar</i>	Не вказано	[148]

1	2	3	4	5	6
Hesheng3	Незрілі зародки	GV3101	<i>AtNHX1</i> <i>nptII</i>	1,3–2,9%	[173]
Yan103					
Yanyou361					
Shannong 9956049	Незрілі зародки	LBA4404	<i>nptII</i>	1,18%	[174]
Shirane komugi	Зріле насіння	LBA4404	<i>nptII</i>	9,82%	[12]
		M-21			
Een1	Зріле насіння	LBA4404	<i>nptII</i> <i>gus</i>	3–31%	[105]
1	2	3	4	5	6
Crocus	Генеративні органи	C58C1	<i>Lc/C1</i> <i>nptII</i>	0,3–0,6%	[175]
Chinese spring		AGL1			
Bobwhite	Незрілі зародки	Не зазначено	<i>Act1:aroA/CP</i>	2,8–5,7%	[176]
Certo	Незрілі зародки	LBA4404	<i>gfp</i> <i>hpt</i>	10%	[131]
Crocus	Колоски	C58C1	<i>Lc/C1</i> <i>nptII</i> <i>hpt</i>	0,44%	[177]
		AGL1			
Gemmiza9	Зрілі зародки	LBA4404	<i>nptII</i> <i>gus</i>	8,7%	[178]
Gemmiza10					
CB037	Незрілі зародки	C58C1	<i>nptII</i> <i>gus</i>	0,058%	[102]
Kenong199					
Xinchun9					
Lunxuan987					
Shi4185					
NB1	Незрілі зародки	C58C1	<i>Act1:EYFP</i> <i>nptII</i>	5,6%	[179]
HD2329	Зріле насіння	GV2260	<i>nptII</i> <i>gus</i>	1,16%	[180]
Bobwhite	Незрілі зародки	C58C1	<i>AMTP:BLF</i> <i>nptII</i>	Не вказано	[181]
ND146	Незрілі зародки	LBA4404	<i>nia</i> <i>nptII</i>	1,68%	[12]
JM6358				0,40%	
Sourav	Зрілі зародки; незрілі зародки	LBA4404 EHA105	<i>nptII</i> <i>gus</i>	Не вказано	[145]
Gourav					
Kanchan					
Protiva					

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5	6
<i>Triticum durum</i>					
PDW215	Зрілі зародки; калюс	LBA4404	<i>pin2</i> <i>bar</i>	1,28–1,77%	[170]
PDW233					
WH896					
Sohag2	Колоски	LBA4404	<i>P5CS</i> <i>gus</i> <i>nptII</i>	0,9%	[182]
PDW215	Зріле насіння	LBA4404	<i>bar</i>	0,84%	[180]
<i>In planta</i>					
<i>Triticum aestivum</i>					
Crocus	Колоски	C58C1 AGL1	<i>nptII</i> <i>hpt</i>	0,44%	[177]
GA-2002	Калюс апикального походження ; КОЛОСКИ	LBA4404	<i>nptII</i> <i>gus</i>	Не вказано	[183]
Shiranekom ugi	Зрілі зародки	M-21	<i>iaaM</i> <i>ipt</i>	33%	[98]
		LBA4404	<i>gus</i> <i>nptII</i> <i>hpt</i>		

#### **1.4.2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* як метод отримання трансгенних рослин**

Методи генетичної трансформації *in vitro* широко використовуються для отримання рослин з покращеними властивостями, але вони мають ряд недоліків: необхідність дотримання асептичних умов вирощування досліджуваного матеріалу; довготривалість експериментів; можлива поява сома клонів під час регенерації *in vitro*; залежність ефективності трансформації від генотипу досліджуваного об'єкту. Низький морфогенетичний потенціал однодольних утруднює регенерацію трансформантів та отримання фертильних рослин [8]. Крім того, цінні трансгенні рослини можуть бути втрачені на етапі адаптації до нестерильних умов вирощування, що призводить до зменшення кількості отриманих трансформантів [184].

З початку використання *Agrobacterium* для генетичної трансформації рослин значний інтерес викликали і продовжують викликати експланти, які не залежать від регенераційної здатності тканинної культури та забезпечують високу частоту трансформації.

На даний час все більшої популярності набуває метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, оскільки він дозволяє уникнути використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів, а також дає можливість уникнути соматоклональної мінливості [184-186]. Показано, що частота трансформації рису та пшениці за допомогою даного методу є значно вищою у порівнянні з іншими методами генетичної трансформації [98, 187].

Вперше протокол трансформації *in planta* було розроблено для модельного об'єкту *A. thaliana* [9]. Пізніше у роботах Chang, Katavic та їх колег був застосований метод “clip-and-squirt”. Даний метод передбачає зрізанням суцвіть з подальшим нанесенням бактеріальної суспензії. [188]. Запропонований у 1998 році спосіб “floral dip” занурення квітів у бактеріальну суспензію для *Arabidopsis* дозволив виключити стадію вакуумної інфільтрації [189]. З того часу даний метод трансформації успішно використовують для різних

сільськогосподарських культур, включаючи овочеві (редис, помідори і перець) [8, 190, 191] та злаки (пшениця, кукурудза, рис) [177, 188, 193-197].

Під час обробки суцвіть бактеріальною суспензією насамперед яйцеклітина, клітини зародкового мішка та пилкові зерна у пилковій трубці (ПТ), що проростає вважаються клітинами-мішенями для перенесення Т-ДНК у *Arabidopsis*. Існує ряд факторів, які здатні сприяти передачі агробактеріальної Т-ДНК через неї: ПТ поглинає речовини з філаментів маточки за допомогою ендоцитозу і, таким чином, *Agrobacterium* (або Т-комплекс) може туди потрапити; ПТ, що проростає рухається до зародкового мішка, транспортуючи *Agrobacterium* (або Т-комплекс), які в свою чергу отримують доступ до яйцеклітини; Т-комплекс може бути перенесений в яйцеклітину шляхом неспецифічного ендоцитозу, оскільки в плазматичній мембрані клітин пилкового зерна та яйцеклітини не було знайдено молекул, які беруть участь у злитті мембран. При агробактеріальній трансформації пилку, інсерції Т-ДНК не спостерігається [193]. Дослідники повідомляють про відсутність позитивного результату гібридизації за Саузерном в поколінні  $T_1$ , що свідчить про нестабільну інтеграцію в ядерний геном. Наявність трансформантів покоління  $T_0$  пояснюється передачею Т-ДНК в ендofітну мікрофлору рослини під час вирощування зерен трансформованих рослин у ґрунті без селективного тиску [163, 185].

У випадку *T. aestivum* тканини-мішені для передачі Т-ДНК не були визначені, але, опираючись на роботи з *Arabidopsis*, саме яйцеклітина є вірогідною мішенню для вбудування Т-комплексу [196-198]. Тим не менш, оптимальні умови і точний механізм передачі Т-ДНК у зародкові клітини за допомогою методу *in planta* не описані.

Припускають, що клітини агробактерій досягають меристеми через мікропіле, потрапляють у міжклітинний простір зародка і зберігаються там протягом розвитку рослини. Після трансформації генеративних тканин *in planta* Т-ДНК присутня лише в одній із гомологічних хромосом трансформанта. Це є підтвердженням того, що інтеграція Т-ДНК відбувається на стадії розвитку

генеративних органів, коли клітини жіночих і чоловічих тканин вже сформувалися [199].

Метод «floral dip» простий, зручний та економний, дозволяє уникнути бактеріальної контамінації експлантів, яка зазвичай присутня в культурі тканин *in vitro* [200]. Однак, даний метод характеризується рядом недоліків: низька ефективність трансформації, потреба у великій кількості квітів та насіння, відсутність конкретної тканини-мішені чи органу для трансформації, а також видова обмеженість [201]. Попри це метод “floral dip” у випадку *A. thaliana* вимагає великої кількості бактеріальної культури, вирощеної у рідкому середовищі і, як наслідок, об’ємних шейкерів і центрифуг [202].

Результати численних досліджень свідчать про те, що з насіння, отриманого після трансформації клітин зав’язі, можуть розвиватися стабільні трансформанти [109, 191].

Перші протоколи генетичної трансформації за допомогою даного методу передбачали використання середовища для інфільтрації, яке містило ацетосирінгон та Tween 20. Для трансформації пилку його наносили піпеткою на квітки пшениці безпосередньо перед цвітінням. Проте, передачі трансгену у наступні покоління не отримано. Цілком можливо, що одержані таким чином рослини характеризуються химерністю [163, 177].

Вирішальне значення для успішної трансформації пшениці *in planta* мають стадії розвитку рослини під час інокуляції, будова квітки і тривалість контакту рослинних тканин з бактеріальною суспензією [34, 185]. У пшениці при надто ранньому зануренні колоса (довжина колоса складає 4 см) в бактеріальну суспензію відмічається відсутність насіння, або його незначна кількість. Стадія одноядерних мікроспор (довжина колоса близько 6-7 см), коли колос ще не вийшов з піхви є оптимальною для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* методом “floral dip”. Залежно від умов навколишнього середовища обробку агробактеріальною суспензією слід проводити приблизно за 4-7 днів до цвітіння [177]. В *Arabidopsis* спостерігається відсутність

трансформантів у випадку обробки суцвіть пізніше, ніж за 4 дні до цвітіння. Ймовірно це пов'язано з особливостями формування гінецею [189].

Температура навколишнього середовища є важливим чинником, що впливає на перебіг процесу трансформації, а також на його ефективність [194, 203]. Температурний діапазон обмежується термочутливістю білків, які беруть участь в переносі T-ДНК. Встановлено, що температура нижче 15 °С і вище 29 °С є критичною для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Оптимальною для експресії *vir*-генів вважається 25 °С, однак для функціонування апарату *vir*-залежного перенесення необхідна температура 19 °С. При 28 °С ефективність трансформації значно знижується. Ймовірно, це пов'язано з негативним впливом підвищеної температури на зв'язування з клітинною мембраною білків VirB-VirD4, які беруть участь у перенесенні T-ДНК через мембрану клітини. Крім того, понижується індукція білка VirD2, що відповідає за вирізання T-ДНК і пілотування T-нитки [185, 204-206]. У процесі підвищення температури до 32 °С експресія *vir*-генів повністю пригнічується, оскільки відсутня активність рецепторного білку VirA [207]. Діапазон температур від 19 до 22 °С є оптимальним для експресії генів *Vir* в *Agrobacterium* [205], у той час, як 28 °С – критична температура для виділення та асоціації *Vir*-залежних агробактеріальних T-пілів необхідних для успішної передачі T-ДНК [194].

Для більшості однодольних рослин температура під час спільного культивування з *Agrobacterium* складає 24-28 °С. Однак показано, що 22-25 °С під час обробки колосів пшениці бактеріальною суспензією є менш сприятливими порівняно з 18-20 °С [192]. Різні дослідники наводять суперечливі дані стосовно впливу температури на процес інтеграції T-ДНК. Dillen і співавтори найвищу частоту трансформації у *A. thaliana* отримали за 22 °С, в той же час, як Salas та ін. спостерігали найбільшу кількість трансформантів тютюну за температури 25 °С [161, 206]. Згідно спостережень вітчизняних науковців достовірної різниці за показником зав'язуваності насіння, отриманого за різних температурних варіантів не відмічається. Проте,

під час добору на селективному середовищі, насіння отримане за 20–22 °С проростало швидше та, загалом, вдалось отримати більшу кількість проростків у пшениці [208].

Ефективність трансформації в значній мірі залежить і від генотипу рослини: насамперед від фізіологічних та генетичних особливостей. У дослідженнях Бента трансформації піддавали декілька екотипів арабідопсиса. В результаті у трьох з них ефективність трансформації була подібною, а у трьох інших спостерігалось 10-100 кратне її зменшення, в окремих випадках – відсутність трансформантів [189]. Також відмічено, що трансформація різних ліній кукурудзи відбувається з різною ефективністю [185].

Зазвичай для трансформації використовують молоді бактеріальні культури (до стаціонарної фази), отримані за температури 28 °С у рідкому живильному середовищі. Використання *A. tumefaciens* на пізній стадії – стаціонарна фаза – не впливає на ефективність отримання трансформантів методом “floral dip”. Важливим компонентом у живильному середовищі для трансформації *in planta* виявилась сахароза. Збільшення частоти трансформації спостерігалось під час її внесення в інокуляційне середовище у кількості 10%. [189, 209]. Широке розповсюдження отримало використання Silwet L77. Відсутність його в середовищі для інокуляції нерідко призводить до зменшення ефективності даного процесу. Встановлено, що 0,02-0,05% Silwet L77 – оптимальна концентрація для трансформації. Подальше її підвищення знижує ефективність отримання трансформантів, а 0,1% спричиняє некроз тканин рослини. Використання інших поверхнево активних речовин таких, як Tween-20 або прулонова кислота F68 майже не впливає на процес трансформації *in planta* [8, 185].

Час контакту *Agrobacterium* з тканинами рослин має суттєве значення у трансформаційному процесі. Збільшення часу витримки у бактеріальній суспензії підвищує ефективність трансформації. Так, наприклад, в арабідопсиса занурення суцвіть у суспензію *Agrobacterium* протягом 2 хв. підвищує її ефективність у 2 рази порівняно із витриманням протягом 1 хв. [210]. Під час

проведення 2-3 кратної інокуляції підвищується частота отримання трансформантів [189, 202].

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* ґрунтується на здатності *A. tumefaciens* передавати гени в геном клітин, які вже компетентні до розвитку в окремі органи, але ще залишаються недиференційованими. Отримані внаслідок даного процесу первинні трансформанти T<sub>0</sub> характеризуються химерністю. З огляду на зазначене вище, під час застосування даного методу варто враховувати наступні фактори:

- трансформація *in planta* залежить від кількості особин T<sub>0</sub>, які можуть вижити і розвиватися в нормальні зрілі рослини після інфікування *Agrobacterium*;
- інтеграція трансгенів має відбуватися в клітинах, з яких у подальшому розвиватимуться репродуктивні структури з наступним одержанням стабільних трансформантів [211].

На сьогодні в біотехнології все більшої популярності набувають методи трансформації, які дозволяють уникнути використання культури тканин та зменшити собівартість даного процесу. Метод генетичної модифікації рослин *in planta* може розглядатися як альтернатива технології отримання трансгенних рослин *in vitro*. Не дивлячись на те, що технологія *in planta* характеризується чималими перевагами, її застосування обмежене багатьма невідомими. Так для *T. aestivum* клітини-мішені під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* не описані, також залишаються невідомими оптимальні умови та точний механізм передачі T-ДНК у зародковій клітині.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріал досліджень

Матеріалом досліджень були сорти м'якої пшениці вітчизняної селекції Зимоярка та Подолянка, надані Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України. За даними Гончарука О. М. та колег саме ці сорти характеризуються високим морфогенним потенціалом в культурі апікальних меристем [212].

Сорт Зимоярка є дворучкою – поєднує два типи розвитку: озимий та ярий. Його занесено до Державного реєстру сортів рослин України у 2007 році для вирощування у Лісостеповій зоні України. Характеризується сорт Зимоярка середньою стиглістю, має високий природній потенціал продуктивності. За даними ІФРГ НАН України протягом періоду конкурсного випробування (2004-2006 рр.) урожай Зимоярки становив 68,3-84,4 ц/га, як озимої форми, та 42,2-55,0 ц/га, як ярої. Середньорослий, з високими борошномельними та хлібопекарськими властивостями, вегетаційний період становить 273-297 днів. Стійкий до посухи, вилягання, ураження борошнистою россою. Зерно сорту Зимоярка містить 13,8-16,5% білка, 28,1% сирової клейковини, сила борошна – 296-437 а.о., об'єм хліба – 1050-1480 мл. Сорт віднесено до сильних пшениць.

Сорт Подолянка належить до озимих пшениць, з високою зимостійкістю, посухостійкістю, стійкістю до осипання зерна, середньою стійкістю до вилягання та ураження борошнистою россою і бурою листковою іржею. Його занесено до реєстру сортів рослин України у 2003 році для вирощування у Поліській, Лісостеповій і Степовій зонах України. Характеризується даний сорт відмінними борошномельними та хлібопекарськими властивостями. Зерно містить 13,5-14,7% білка, 28,7-31,5% сирової клейковини, сила борошна – 320-410 а. о. Сорт Подолянки віднесено до сильних пшениць.

У дослідженні були використані калюсні культури, отримані з апікальних меристем 3-добових проростків та з незрілих зародків *T. aestivum* сортів Зимоярка та Подолянка. Аналіз рослин-регенерантів, індукованих з калюсної культури,

здійснювався за допомогою молекулярно-генетичних, гістологічних і статистичних методів.

## **2.2. Одержання первинної калюсної культури пшениці та умови культивування**

В якості первинних експлантів для калюсогенезу використовували апікальні меристеми пшениці сортів Зимоярка та Подолянка. Такий вибір вихідного матеріалу зумовлено його доступністю у великих кількостях упродовж року [112]. Для одержання асептичних проростків-донорів апікальних меристем насіння послідовно стерилізували 1%-м розчином  $\text{KMnO}_4$  протягом 3 хв, 1%-м розчином  $\text{AgNO}_3$  – 2 хв, 96%-м етиловим спиртом – 1 хв і тричі промивали стерильною дистильованою водою [213-214]. Після стерилізації насіння пророщували протягом 3 діб у скляних посудинах об'ємом 200 мл за температури  $24\text{ }^\circ\text{C}$  і 16-годинного фотоперіоду на безгормональному середовищі МС [149]. Апікальні меристеми виділяли з 3-добових проростків і розміщували на модифікованому середовищі МСК (табл. 2.1), яке містило 2 мг/л 2,4-Д і 10 мг/л  $\text{AgNO}_3$ , вітаміни за Гамборгом [46] та 20 г/л сахарози. Експланти поміщали у чашки Петрі (близько 50 шт.) так, щоб досягалася максимальна площа контакту з середовищем і культивували їх за  $26\text{ }^\circ\text{C}$  у темряві впродовж 18 діб до отримання калюсу.

Незрілі зародки виділяли з насіння на 13-14 добу після запилення [102]. Попередньо колоси промивали у миючому засобі, дистильованій воді та просушували. Отримане насіння піддавали стерилізації:  $\text{AgNO}_3$  – 3 хв, 96%-й етиловий спирт – 1 хв та триразово промивали стерильною дистильованою водою. Ізольовані незрілі зародки розміром 1,0-1,2 мм поміщали щитками вгору у чашки Петрі (приблизно 50 шт.) на модифіковане живильне середовище МСК (табл. 2.1). Культивування проводили в темряві протягом 4-6 діб за температури  $26\text{ }^\circ\text{C}$  до отримання первинного калюсу.

## Середовища, використані у дослідженні

Середовище	Солі	Вітаміни	Додаткові компоненти	Цукор	Регулятори росту
Пророщування					
МС	MacroМС, MicroМС	за Морелем	-	20 мг/л	-
Калюсогенез					
МСК	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO <sub>3</sub>	20 мг/л	2 мг/л 2,4-Д
Регенерація					
МСТ	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO <sub>3</sub>	20 мг/л	-
Вкорінення					
MCR1	MacroМС, MicroМС	за Морелем	-	10 мг/л	0,1 мг/л НОК
MCR2	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	0,15 г/л аспарагін моногідрату	10 г/л глюкози, 20 г/л мальтози	-

### 2.3. Визначення впливу синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту на частоту регенерації з калюсу пшениці м'якої

Сформований 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем, переносили на живильне середовище МС для регенерації, доповнене вітамінами за Гамборгом і регуляторами росту (табл. 2.1). Культивування проводили за температури 24 °С протягом 16-годинного фотоперіоду.

Проводили визначення особливостей регенерації пагонів із 325 зразків калюсу на середовищах, доповнених дикамбою (Duchefa Biochemie, 3,6-dichloro-2-methoxy-benzoic acid), 327 – доповнених піклорамом (Duchefa Biochemie, 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid) та 1800 – доповнених БАП («Sigma»). Експланти культивували в чашках Петрі (по 50 шт.). Кількість зразків морфогенного калюсу визначали на 15-ту добу культивування на модифікованих середовищах МС, доповнених різними регуляторами росту. Підрахунок утворених регенерантів проводили з 20-ї до 35-ї доби з інтервалом у 5 діб.

Частоту пагоноутворення визначали як відношення числа калюсних експлантів, з яких утворилися регенеранти, до загального числа експлантів.

Регенеранти відокремлювали від калюсу і для ініціації ризогенезу висаджували на живильне середовище MCR1 (табл. 2.1). Укорінення тривало протягом 2 тижнів за температури 24 °С та 16-годинного фотоперіоду.

Адаптацію регенерантів з добре розвинутою кореневою системою до септичних умов проводили за наступною схемою: 1) сфагновий мох – первинний адаптаційний субстрат, 2) ґрунтосуміш – торф, дернова земля та пісок (2:1:1). Рослини піддавали поступовому загартуванню, збільшуючи експозицію на відкритому повітрі від 20 хв до цілодобового перебування у відкритому стані протягом 2 тижнів. Пристосовані до нестерильних умов регенеранти культивували в умовах теплиці за природного освітлення і температури 22–28 °С.

#### 2.4. Генетичні вектори та агробактеріальні штами

У роботі використовували нопалінові штами *Agrobacterium tumefaciens* ABI та GV3101. Штам ABI містив вектор p014 (рис. 2.1), до складу Т-ДНК якого входили селективний ген *nptII* та маркерний – *sgfp*.

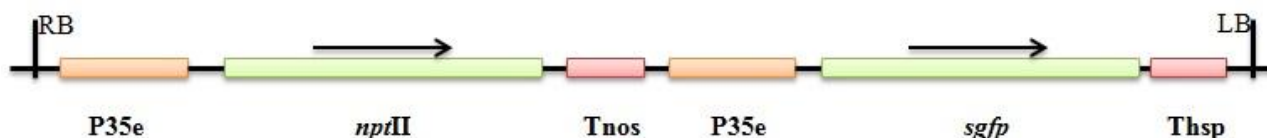


Рис. 2.1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції p014. Показано кодуючі послідовності генів неоміцинофосфотрансферази (*nptII*) та синтетичного зеленого флуоресцентного білку (*sgfp*), підсилені промотором вірусу мозаїки цвітної капусти (P35e), термінатори нопалінсинтази (Tnos) і білку теплового шоку (Thsp). Для генів *nptII* та *sgfp* показані місця посадки пар праймерів PSGA-PSGB та gfp2F-gfp2R відповідно.

Вектор pCB203 у штамі GV3101 *A. tumefaciens* містить репортерний ген  $\beta$ -глюкоринідази (*gus*), а також селективний ген фосфінотрицин-N-

ацетилтрансферази (*bar*), що надає стійкості клітинам рослин до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Продуктом активності гена *bar* є фосфінотрицин ацетил трансфераза – фермент, що нейтралізує фосфінотрицин – здатна забезпечити ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі. Для досягнення високого рівня експресії цих генів у векторі були використані поліубіквітин-1 (*Ubi1*) промотори та інтрони кукурудзи [215-216] (рис. 2.2).

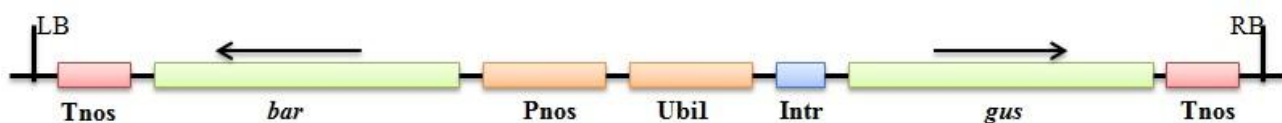


Рис. 2.2. Схематичне зображення T-ДНК вектору pCB203.

## 2.5. Визначення інгібуючого впливу антибіотиків на бактеріальні клітини *Agrobacterium tumefaciens*

З метою визначення інгібуючого ефекту антибіотиків тиментину (Tm), цефотаксиму (Cf) та цефтриаксону (Ct) на *Agrobacterium tumefaciens* штамів ABI і GV3101 використано метод серійного розведення [217-218] та метод дисків, описаний в роботі Priya [219]. Метод серійного розведення полягає у внесенні однакової кількості досліджуваних мікроорганізмів на поживні середовища з різною концентрацією антибіотика. Для цього із добової культури бактерій готували суспензію у фізіологічному розчині з густиною 0,5 за стандартом Макфарланда ( $1,5 \times 10^8$  КУО/мл). Отриману суспензію (0,1 мл) газом висівали на поверхню середовища КА (картопляний агар), доповненого антибіотиками у концентраціях від 200 мг/мл до 500 мг/мл. Культивування проводили у термостаті за температури 30 °C протягом 24 год. Після цього проводили підрахунок КУО.

Для методу дисків щільний газон нічної культури агробактерій висівали на агаризоване живильне середовище Himedia M001 (аналог LB) [219]. Для

отримання суспензії *A. tumefaciens* використовували рідке живильне середовище M002 з відповідними антибіотиками:

- штам ABI – канаміцин (Km) і спектиноміцин (Spс) 100 мг/л;
- штам GV3101 – гентаміцин (Gm) 25 мг/л, рифампіцин (Rf) 50 мг/л і карбеніцилін (Cb) 100 мг/л.

Попередньо стерилізовані диски фільтрувального паперу діаметром 6 мм змочували розчинами досліджуваних антибіотиків, висушували і поміщали на поверхню середовища. Досліджували вплив антибіотиків тиментину (Tm), цефотаксиму (Cef) та цефтриаксону (Cf) на *A. tumefaciens* у наступних концентраціях: 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л, 250 мг/л, 300 мг/л, 350 мг/л, 400 мг/л, 450 мг/л, 500 мг/л.

Культивування проводили у термостаті за температури 27 °С протягом 48 год. По закінченні зазначеного періоду проводили лінійні виміри діаметра зон інгібування навколо дисків.

## **2.6. Визначення впливу антибіотиків на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів пшениці**

Для визначення впливу антибіотиків тиментину та цефтриаксону на утворення морфогеного калюсу і регенерацію використовували сформований 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем пшениці сортів Зимоярка та Подолянка. Калюс поміщали у чашки Петрі (близько 50 шт.) на регенераційне живильне середовище [220], доповнене Tm та Ct у концентраціях від 25 мг/л до 500 мг/л. Культивували за температури 24 °С і 16-год фотоперіоду протягом 30-ти діб. Пасажування здійснювали кожні 14 діб. Кількість зразків морфогеного калюсу відмічали на 14-ту добу культивування. Динаміку регенерації рослин пшениці фіксували з 15-ї по 30-ту добу кожні 5 діб. В якості контролю використовували середовище MCR4 (табл. 3.1) [220]. Відсоток утворення пагонів визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили регенеранти, до загального числа експлантів.

## **2.7. Гістологічне дослідження калюсу пшениці, отриманого на живильному середовищі, доповненому цефтриаксоном**

Калюс апікального походження, культивованій на середовищі MCP4 (табл. 3.1), доповненому антибіотиком цефтриаксоном (400 мг/л), використовували для гістологічного аналізу. Для цього зразки кожної доби фіксували по 10 шт. в FAA (суміш етилового спирту, формаліну та оцтової кислоти), заливали в желатин за стандартною методикою [221] і виготовляли поперечні та поздовжні зрізи товщиною 10 мкм за допомогою заморожуючого мікротома. Зрізи зафарбовували ацетоорсеїном та сафраніном [222]. Препарати досліджували на мікроскопі XSP-146TR, тринокулярному мікроскопі Konus Crystal-45 та фотографували.

## **2.8. Визначення відносної швидкості росту рослин**

Рослини-регенеранти поділяли на групи (близько 5 рослин у групі) за віком та розміром. Вимірювали сиру масу надземної частини рослини та окремо кореневої системи, а також довжину пагона та коренів. Перед зважуванням рослини відмивали від агару та просушували на фільтрувальному папері. Після визначення сирої маси рослинний матеріал поміщали у поліетиленові пакетики з етикетками та висушували шляхом ліофілізації протягом 3-4 діб до сталої ваги та проводили аналогічні виміри. Для обрахунку отриманих даних та побудови графіків використовували формулу Relative growth rate (RGR) [223-224]:

$$RI=(x-x_0)/x_0, \text{ де}$$

$x$  – середнє значення показника росту (суха чи сира маса кореня або рослини, довжина кореня, висота рослини),

$x_0$  – середнє значення показника на початок експерименту або на день укорінення.

Для визначення швидкості росту рослин зважування проводили кожні 5 діб. Період дослідження складав 30 днів.

## **2.9. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці в умовах *in vitro***

З метою одержання трансгенних рослин м'якої пшениці в якості вихідного матеріалу використовували 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем, та 4-6-добовий калюс, одержаний з незрілих зародків пшениці сортів Зимоярка та Подолянка. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 15 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (близько 50 шт.) на живильне середовище для ко-культивування [225]. Ко-культивування здійснювали протягом 48 год у термостаті за температури 27 °С. Після чого експланти поміщали на модифіковане живильне середовище для регенерації MCR4 [220], яке містило 100 мг/л паромоміцину (за використання вектора p014) або 5 мг/л фосфінотрицину (за використання векторної конструкції pCB203) в якості селективних агентів для попереднього відбору трансформантів. Культивування здійснювали за температури 24 °С і 16-год фотоперіоду протягом 30-ти діб. Кожні 14 діб проводили пасажування на свіже регенераційне середовище.

Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на живильне середовище для вкорінення MCR2 (табл. 2.1). Культивували за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду у баночках об'ємом 200 мл. Вкорінення тривало 2-3 тижні. Рослини з достатньо розвиненою кореневою системою адаптовували до нестерильних умов (як описано у п. 2.3), переносили в посудини з ґрунтом і культивували в умовах теплиці за температури 22–28 °С, вологості 71% та природного освітлення.

## **2.10. Генетична трансформація пшениці за допомогою методу *in planta***

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження. Використовували рослини пшениці, отримані з насіння сортів Подолянка та Зимоярка.

Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5-7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка [175; 177]. Проводили їх кастрування,

залишаючи по 12-14 колосків на колос. Після цього на кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування. Через три доби проводили інокуляцію суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини.

### 2.11. Молекулярно-генетичний аналіз рослин

Частину листя рослин пшениці покоління  $T_0$  аналізували на присутність послідовностей генів *nptII*, *sgfp* і вірулентності агробактерій (*VirC*) за використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Загальну ДНК виділяли із листового матеріалу рослин пшениці, трансформованих векторами p014 та pCB203 за допомогою *A. tumefaciens* в культурі *in vitro* та методом *in planta*, які імовірно містили гени *nptII* або *bar*.

Реакційні суміші включали: специфічні праймери (табл. 2.2.), по 2 мкл буфера для ПЛР 10×DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Fisher Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфата (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q.

Загальну РНК також виділяли із листового матеріалу рослин пшениці, трансформованих генетичними векторами p014 та pCB203. Перед використанням препаратів РНК проводили гідроліз залишкової ДНК. Для цього використовували ДНКазу I та 1-5 мкг загальної РНК. Реакційну суміш витримували 30 хв. при 37 °С. Для зупинки реакції додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та витримували 10 хв. при 65 °С для денатурації ферменту ДНКазу I. Синтез кДНК здійснювали з використання набору First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) згідно інструкцій виробника.

У випадку зворотної транскрипції використовували: 4 мкл 5×буфер для реакції, 1 мкл Oligo (dT)<sub>18</sub> 100 мкМ (0,5 мкг/мкл), 2 мкл 10 мМ еквімолярна суміш дНТФ, 5 мкл ( $\approx$  600 нг) РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки), 0,5 мкл RiboLock RNase inhibitor, 40 од/мкл, 2 мкл Reverse transcriptase, 20 од/ мкл. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q (Merck Millipore).

Визначення експресії транскриптів проводили шляхом ЗТ-ПЛР, використовуючи 2 мкл продуктів реакції ЗТ, доданих у 20 мкл реакційної суміші та специфічні праймери до кожного з генів (табл. 2.2).

Реакції проводили з використанням наступних профілів:

1. ПЛР для визначення транскрипта *nptII*: початкова денатурація 3 хв. при 94 °С, 34 цикли – денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 60 °С, елонгація 40 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв. при 72 °С. Використовувалась пара праймерів № 1 (табл. 2.2).
2. Мультиплексна низхідна (Touchdown) ПЛР для визначення послідовності гена зеленого флуоресцентного білка (*sgfp*): початкова денатурація 4 хв. при 94 °С, 7 циклів – денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 45 с при 68 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), елонгація 30 с при 72 °С та 25 циклів – денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 60 °С, елонгація 30 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв. при 72 °С. Використовувались пари праймерів № 2 і № 4 (табл. 2.2).
3. ПЛР для визначення транскрипта *nptII*: початкова денатурація 3 хв. при 94 °С, 34 цикли – денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 60 °С, елонгація 40 с при 72 °С, фінальна елонгація 5 хв. при 72 °С. Використовувалась пара праймерів № 1 (табл. 2.2).

## Праймери, використані у ПЛР-аналізі біотехнологічних рослин

№ п/п	Гени, які детектували	Праймери	Нуклеотидні послідовності праймерів, які використовувалися	Довжина очікуваного фрагмента
1.	<i>nrpIII</i>	PSGA форвардний PSGB реверсний	5'-GAG-GCT-ATT-CGG-CTA-TGA-CTG-3' 5'-CAA-GCT-CTT-CAG-CAA-TAT-CAC-G-3' [226]	647 п.н.
2.	<i>sgfp</i>	gfp2F форвардний gfp2R реверсний	5'-CAG-CGT-GAA-CGG-CCA-CAA-GTT-CA-3' 5'-CGA-TGC-GGT-TCA-CCA-GGG-TGT-3' (власний дизайн)	311 п.н.
3.	<i>VirC</i>	VCF форвардний VCR реверсний	5'-ATC-ATT-TGT-AGC-GAC-T-3' 5'-AGC-TCA-AAC-CTG-CTT-C-3' [227]	720 п.н.
4.	<i>TaTM20</i> референтний ген пшениці	RTF форвардний RT R реверсний	5'-AAG-GGT-TGC-TCC-TCT-TCG-CGA-TCT-TG-3' 5'-GTA-CAT-GCC-AGC-ACC-GTA-TGG-ATT-G-3' [228]	900 п.н.
5.	<i>bar</i>	SBE F форвардний SBE R реверсний	5'-CAT-CGA-GAC-AAG-CAC-GGT-CA-3' 5'-GAA-ACC-CAC-GTC-ATG-CCA-GT-3' [229]	405 п.н.
6.	<i>TaG3PDH</i> Референтний ген пшениці	TaG3PDHF форвардний TaG3PDHR реверсний	5'-CAA-CGC-TAG-CTG-CAC-CAC-TAA-CT-3' 5'-ACT-CCT-CCT-TGA-TAG-CAG-CCT-T-3' [228]	604 п.н. – ДНК 300 п.н. – РНК

4. ПЛР для визначення наявності *bar*-гена: початкова денатурація 3 хв. при 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. при 72 °С. Використовувалась пара праймерів № 5 (табл. 2.2).

5. ПЛР для визначення наявності референтного гена *TaG3PDH*: початкова денатурація 4 хв. при 94 °С, 34 цикли – денатурація 30 с при 94 °С, ренатурація 30 с при 58 °С, елонгація 30 хв. при 72 °С, фінальна елонгація 10 хв. при 72 °С. Використовувалась пара праймерів № 6 (табл. 2.2).

Реакції ампліфікації проводили в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) і Mastercycler gradient (Eppendorf). Продукти

ампліфікації розділяли в 1,2% агарозному гелі у присутності 0,5 мкг/мл бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

### **2.12. Статистичний аналіз результатів**

Отримані дані були оброблені статистично за допомогою програм ANOVA та Excel. Для підтвердження достовірності результатів описані дослідження проводили тричі. Статистичну достовірність відмінностей між отриманими даними оцінювали за допомогою критерію Стюдента. Розраховували найменшу істотну різницю (НІР),  $p \leq 0,05$ .

Проводили дисперсний аналіз, до даних, виражених в процентах перед його проведенням застосовували арксинус не перетворення [230]. Для багатofакторного дисперсійного аналізу [231] та побудови графіків використовувався інтерпретатор мови програмування R [232] версії 3.0.2.

## РОЗДІЛ 3

# ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ *TRITICUM AESTIVUM IN VITRO*

### 3.1. Вплив регуляторів росту на частоту регенерації пагонів з калюсу м'якої пшениці

#### 3.1.1. Застосування 6-бензиламінопурину для регенерації пагонів пшениці м'якої

Процес підбору оптимального живильного середовища – основа біотехнології рослин, тому у багатьох лабораторіях проводять оптимізацію умов культивування *in vitro* злакових і, зокрема, пшениці. Результатом оптимізації живильних середовищ шляхом варіювання елементів живлення та натуральних і синтетичних регуляторів росту є створення технології культивування певного виду, сорту, гібриду рослин *in vitro*. Тому, одним із завдань дисертаційного дослідження було встановлення залежності морфогенних реакцій калюсних тканин пшениці від вмісту в живильному середовищі регулятора росту – БАП.

Експланти (апикальні меристеми, а в подальшому і калюс) отримували за розробленою нами методикою: стерилізація насіння, отримання 3-добових асептичних проростків пшениці, виділення апікальних меристем та отримання повністю сформованого 18-добового калюсу (рис. 3.1). Саме із 18-добового калюсу спостерігається найвища частота регенерації пагонів *T. aestivum*. Калюс на 14 добу культивування ще недостатньо дедиференційований, а частота утворення пагонів з 21-добового нижча порівняно з частотою регенерації пагонів з 18-добового.

Регенераційна здатність злакових рослин залежить від наявності в утвореному калюсі меристематичних острівців [50, 83]. На 15-ту добу культивування калюсу апікального походження за умов освітлення відзначали появу зелених осередків. Такий калюс відносили до морфогенного типу. Пізніше частина морфогенних калюсів утворювала регенеранти. Розвиток

пагонів починався на 3-й тиждень культивування 18-добового калюсу на регенераційному середовищі.

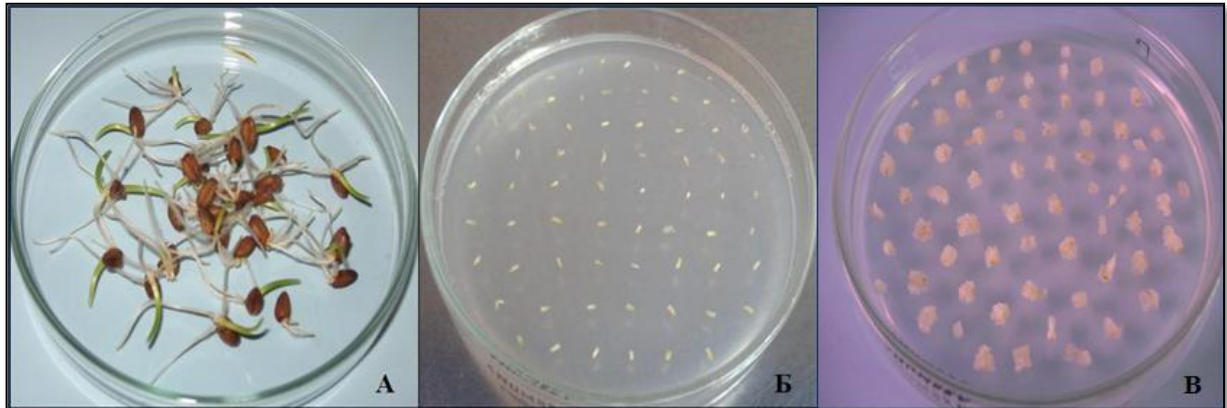


Рис. 3.1. Первинні експланти: А – проростки пшениці сорту Зимоярка на 3-тю добу пророщування; Б – виділені апікальні меристеми; В – 18-добовий калюс.

Було проведено вивчення впливу БАП у концентраціях 0,5; 0,75 та 1 мг/л та проаналізовано 1900 зразків калюсу пшениці сорту Зимоярка та 2000 – сорту Подолянка.

При внесенні у модифіковане живильне середовище МС БАП у кількості 0,75 мг/л (середовище МСР15, табл. 3.1) спостерігалася найвища частота ( $15,0 \pm 0,6\%$ ) утворення пагонів пшениці сорту Зимоярка (табл. 3.2) порівняно з контролем (МС) та середовищами, які містили інші концентрації БАП (МСР13 та МСР 14, табл. 3.1).

Для сорту Подолянка максимальна кількість пагонів ( $21,3 \pm 1,1\%$ ) утворювалася за наявності у живильному середовищі МС, доповненому 1 мг/л БАП (середовище МСР13, табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1

Живильні середовища, використані при дослідженні синтетичних регуляторів росту

Середовище	Базовий склад	Вітаміни	Додаткові компоненти	Регулятори росту
MCP1	МС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO <sub>3</sub>	1 мг/л БАП; 0,2 мг/л дикамби
MCP2				1 мг/л БАП; 0,4 мг/л дикамби
MCP3				1 мг/л БАП; 0,6 мг/л дикамби
MCP4				0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклораму
MCP5				0,5 мг/л БАП; 0,25 мг/л піклораму
MCP6				0,5 мг/л БАП; 0,5 мг/л піклораму
MCP7				0,5 мг/л БАП, 0,4 мг/л дикамби
MCP8				0,15 мг/л піклораму; 0,75 мг/л БАП
MCP9				1 мг/л БАП, 0,15 мг/л піклораму
MCP10				0,5 мг/л БАП, 0,2 мг/л дикамби
MCP11				0,75 мг/л БАП, 0,2 мг/л дикамби
MCP12				1 мг/л БАП, 0,25 мг/л піклораму
MCP13				1 мг/л БАП
MCP14				0,5 мг/л БАП
MCP15				0,75 мг/л БАП
MCP16				0,2 мг/л дикамби
MCP17				0,15 мг/л піклораму
MCP18				0,5 мг/л БАП, 0,6 мг/л дикамби
MCP19				0,75 мг/л БАП, 0,4 мг/л дикамби
MCP20				0,75 мг/л БАП, 0,6 мг/л дикамби
MCP21				0,75 мг/л БАП, 0,15 мг/л піклораму
MCP22				0,75 мг/л БАП, 0,25 мг/л піклораму
MCP23				0,75 мг/л БАП, 0,5 мг/л піклораму
MCP24				1 мг/л БАП, 0,5 мг/л піклораму
MCP25				0,4 мг/л дикамба
MCP26				0,6 мг/л дикамби
MCP27				0,25 мг/л піклораму
MCP28				0,5 мг/л піклораму
MCTP	МС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO <sub>3</sub> , цефтриаксон	-

## Вплив фітогормонів та синтетичних регуляторів росту на частоту регенерації двох генотипів пшениці

		Зимоярка							
		Дикамба				Піклорам			
БАП	Концентрація мг/л	0	0,2	0,4	0,6	0	0,15	0,25	0,5
	0	5,4±1,5%	13,3±1,6%	10,0±1,2%	6,3±0,5%	5,4±1,5%	28,3±1,6%	13,6±1,1%	12,5±1,6%
	0,5	10,7±1,0%	4,5±0,4%	5,5±1,7%	14,3±1,2%	10,7±1,0%	35,5±0,6%*	25,1±1,1%	25,0±1,1%
	0,75	15,0±0,6%	11,1±1,1%	7,1±1,4%	4,6±0,8%	15,0±0,6%	15,0±0,5%	12,7±0,6%	10,3±0,7%
	1	14,6±0,8%	16,1±0,6%*	12,1±1,0%*	3,7±0,2%	14,6±0,8%	20,6±0,9%	14,7±1,6%	11,3±0,7%
		Подільянка							
		Дикамба				Піклорам			
БАП	Концентрація мг/л	0	0,2	0,4	0,6	0	0,15	0,25	0,5
	0	5,4±1,5%	13,3±0,4%	13,3±0,6%	6,7±0,8%	5,4±1,5%	15,1±0,6%	11,8±0,6%	10,8±1,2%
	0,5	20,6±0,5%	20,3±1,5%	21,3±1,5%	14,3±1,0%	20,6±0,5%	30,8±0,4%	13,3±0,8%	28,3±1,3%
	0,75	20,0±1,0%	21,8±1,8%	19,0±1,4%	16,7±1,2%	20±1,0%	17,7±0,8%	16,7±1,2%	6,7±1,6%
	1	21,3±1,1%	23,9±0,8%	13,0±0,7%	11,3±1,8%	21,3±1,1%	18,7±1,2%	9,5±0,6%	6,7±1,7%

Примітка: \* $p \leq 0,05$ .

### **3.1.2. Вплив синтетичних ауксинподібних регуляторів росту на регенерацію пагонів з калюсу м'якої пшениці сортів Зимоярка та Подолянка**

Морфогенетичний потенціал рослинної клітини проявляється в системах *in vitro* у більш широкому діапазоні, ніж у природних умовах, завдяки еволюційно обумовленій здатності до регенерації.

Одним із завдань при роботі з культурою *in vitro* є розробка методів регенерації, як біотехнологічного інструменту для створення нових форм рослин і, зокрема, пшениці.

Вивчали вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації пагонів з калюсної культури пшениці сортів вітчизняної селекції Зимоярка та Подолянка апікального походження. За даними літератури ці речовини зазвичай використовують як додаткові компоненти регенераційних середовищ, тому їх морфогенну дію раніше не було описано. У нашій роботі проводили дослідження впливу піклораму та дикамби як самостійних екзогенних регуляторів росту на регенерацію пагонів пшениці двох генотипів.

Показано, що частота регенерації на живильних середовищах, доповнених 0,2 мг/л дикамби (середовище МСР16) та 0,15 мг/л піклораму (середовище МСР17) є найвищою і становить  $13,3 \pm 1,6\%$  та  $28,3 \pm 1,6\%$  відповідно для сорту Зимоярка та  $13,3 \pm 0,4\%$  (середовище МСР16) і  $15,1 \pm 0,6\%$  (середовище МСР17) для сорту Подолянка (табл. 3.2). Найменше пагонів (табл. 3.2) для обох генотипів спостерігали при культивуванні на середовищах, доповнених 0,6 мг/л дикамби (середовище МСР26) та 0,5 мг/л піклораму (середовище МСР28) (табл. 3.1).

Було проведено вивчення впливу БАП у різних концентраціях на морфогенетичні процеси пшениці при сталому вмісті дикамби (0,2 мг/л) та піклораму (0,15 мг/л) та проаналізовано 2800 зразків калюсу сортів Подолянка та Зимоярка.

При внесенні 1 мг/л БАП у живильне регенераційне середовище МС, доповнене 0,2 мг/л дикамби (середовище МСР1, табл. 3.1), спостерігали високий відсоток утворення морфогенного калюсу ( $81,3 \pm 0,7\%$ ), який відзначався

задовільним фізіологічним станом та найвищу частоту регенерації для сортів Зимоярка ( $16,1 \pm 0,6\%$ ) та Подолянка ( $23,9 \pm 0,8\%$ ) порівняно з контролем (середовище МСР16) (рис. 3.2, табл. 3.2).

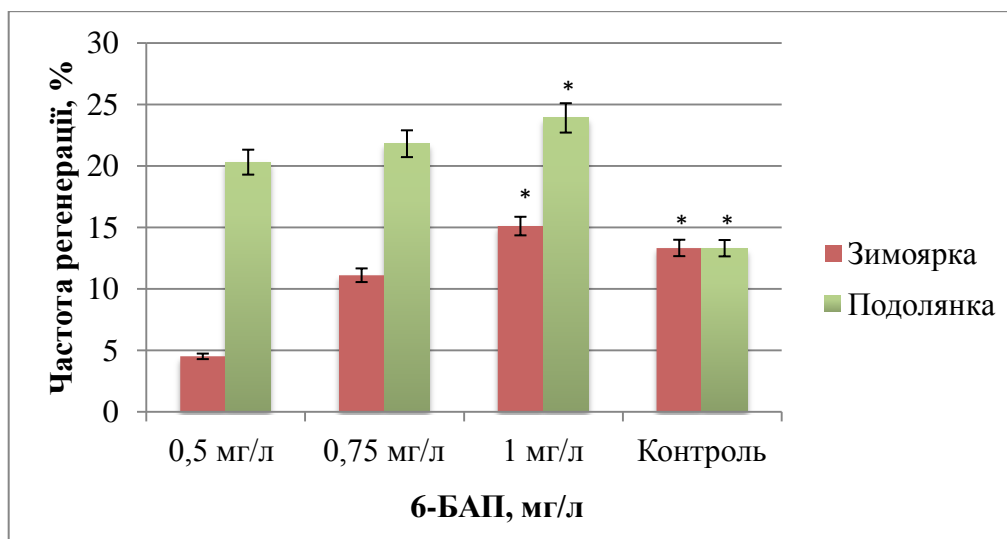


Рис. 3.2. Залежність частоти регенерації від вмісту у живильному середовищі різних концентрацій БАП у поєднанні з 0,2 мг/л дикамба.

*Примітка:* Контроль – модифіковане живильне середовище для регенерації МСР16; \* $p \leq 0,05$ .

При зменшенні вмісту БАП до 0,75 мг/л (середовище МСР11, табл. 3.1) кількість утворених пагонів помітно зменшувалася, проте морфогенних кластерів залишалася багато ( $77,5 \pm 0,8\%$ ) (табл. 3.2). Мінімальна кількість регенерантів спостерігалася на регенераційному середовищі МСР10 (рис. 3.2).

При внесенні 0,5 мг/л БАП у живильне модифіковане середовище МС, доповнене піклорамом (0,15 мг/л) – середовище МСР4, табл. 3.1 – спостерігали максимальний відсоток пагоноутворення для обох генотипів порівняно з контролем (середовище МСР17) та відсотком регенерації на середовищах, які містили інші концентрації БАП (рис. 3.3., 3.6., табл. 3.2). Підвищення вмісту БАП (середовища МСР21 та МСР9, табл. 3.1) спричиняло зниження регенераційної активності, проте позитивно впливало на морфогенетичні процеси у калюсі пшениці (табл. 3.2).

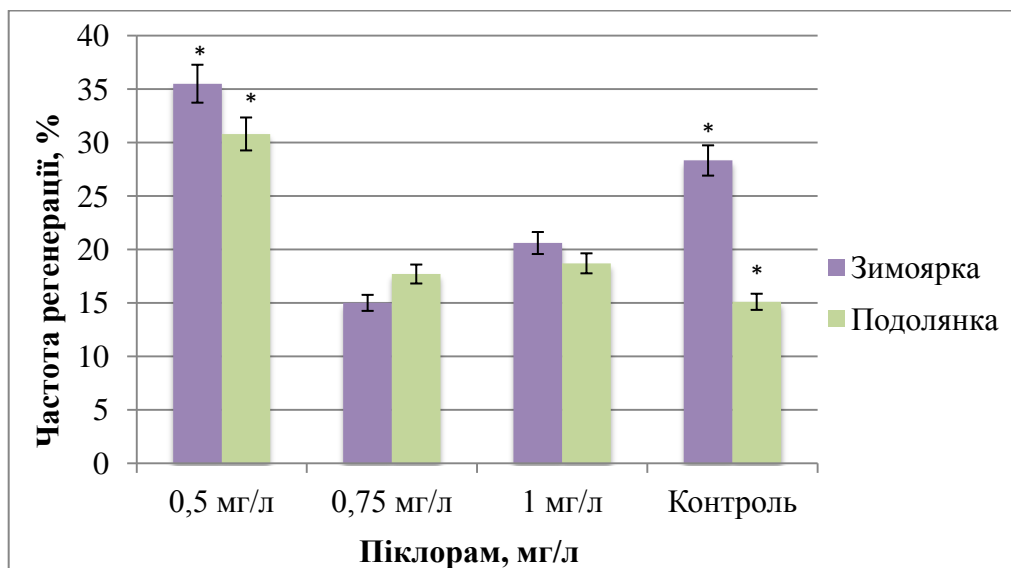


Рис. 3.3. Вплив різних концентрацій БАП на регенераційний потенціал калюсної тканини пшениці за використання живильного середовища для регенерації МС, доповненого 0,15 мг/л піклорами.

*Примітка:* Контроль – модифіковане живильне середовище для регенерації МСР17; \* $p \leq 0,05$ .

За наявності у живильному середовищі дикамби спостерігається нижчий відсоток утворених регенерантів порівняно з частотою пагоноутворення на середовищах, доповнених піклорамом, оскільки значна частина калюсу залишається неморфогенною, переходить у стаціонарну фазу росту та проявляє ознаки старіння.

Було проведено дослідження по з'ясуванню впливу БАП у поєднанні з дикамбою або піклорамом на регенерацію пагонів з калюсу пшениці апікального походження. Для цього визначали вплив різних концентрацій дикамби (0,2 мг/л, 0,4 та 0,6 мг/л) та піклорами (0,15 мг/л, 0,25 та 0,5 мг/л) при сталих концентраціях БАП.

Загалом було перевірено 12 варіантів модифікованого середовища МС (табл. 3.1), доповненого різними концентраціями регуляторів росту.

При дослідженні впливу дикамби контрольним було середовище МСР13; при вивченні впливу піклорами – МСР14 (табл. 3.1).

Загалом проаналізовано 325 зразків 18-добового калюсу при вивченні впливу дикамби, 327 зразків при дослідженні впливу піклораму.

При внесенні у середовище 0,2 мг/л дикамби та 1 мг/л БАП (середовище МСР1, табл. 3.1.) спостерігалось швидке утворення морфогенних острівців та найбільшої кількості пагонів. Впродовж усього періоду культивування постійно з'являлися нові пагони, тобто калюс зберігав морфогенну здатність (рис. 3.4). На пізніших етапах дослідження (30-35 доба) кількість новоутворених регенерантів поступово зменшувалась, а калюс втрачав здатність до морфогенезу.

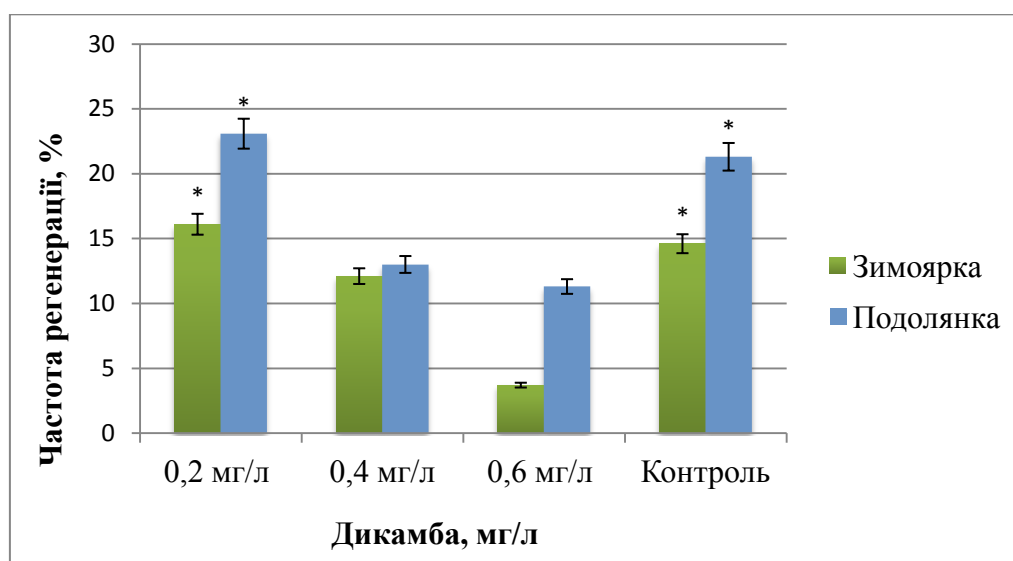


Рис. 3.4. Вплив різних концентрацій дикамби в поєднанні з 1 мг/л БАП на регенераційну здатність калюсних культур пшениці сорту Зимоярка.

*Примітка:* Контроль – модифіковане живильне середовище для регенерації МСР13; \* $p \leq 0,05$ .

При додаванні в модифіковане живильне середовище 0,4 мг/л дикамби та 1 мг/л БАП (середовище МСР2, табл. 3.1.) утворювалась велика кількість морфогенних ділянок, проте органогенез відбувався переважно за типом ризогенезу (рис. 3.5). Кількість утворених пагонів поступово зростала протягом перших 15-ти діб, а на 30-35 добу число новоутворень помітно знижувалося.

За високого вмісту дикамби (0,6 мг/л) в живильному середовищі (МСР3, табл. 3.1) відбувається сповільнення росту калюсу, зниження частоти утворення морфогенних зон і регенерації пагонів, що не спостерігається при додаванні

нижчих концентрацій (табл. 3.2). Слід зазначити, що при внесенні 0,6 мг/л дикамби регенерація розпочиналась значно пізніше – на 30-ту добу (рис. 3.4).

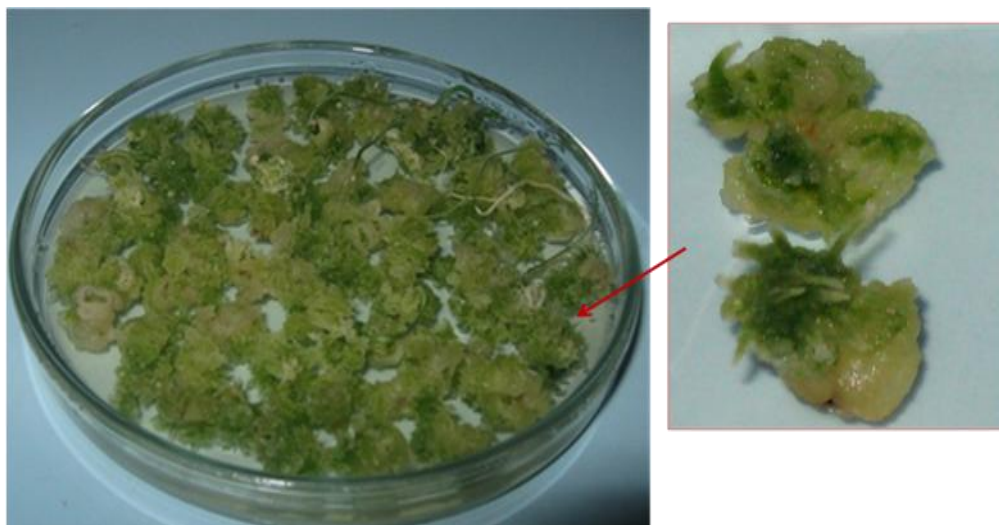


Рис. 3.5. Органогенез культивованих калюсів пшениці на середовищі для регенерації МСР2.

При додаванні різних концентрацій дикамби у живильні середовища, доповнені різними концентраціями БАП частоту регенерації пагонів вдалося підвищити лише до  $16,1 \pm 0,6\%$  у Зимоярки і  $23,9 \pm 0,8\%$  у Подолянки. Таким чином, використовувати дикамбу у поєднанні з БАП недоцільно.

Проведено також вивчення впливу різних концентрацій піклораму (0,15, 0,25 та 0,5 мг/л ) у поєднанні з різними концентраціями БАП на регенерацію пагонів з морфогенного калюсу.

При додаванні в регенераційне середовище піклораму у низьких концентраціях в поєднанні з 0,5 мг/л БАП відбувається стимулювання морфогенетичних процесів у калюсі пшениці. За найнижчої дослідженої концентрації (0,15 мг/л) піклораму (середовище МСР4, табл. 3.1) утворювалась найбільша кількість морфогенних осередків (до 70%), а також регенерантів на 30–35-ту добу культивування (рис. 3.6). Частота регенерації на середовищі МСР4 була найвищою серед досліджуваних живильних середовищ, і складала  $35,5 \pm 0,6\%$  у Зимоярки та  $30,8 \pm 0,4\%$  у Подолянки.

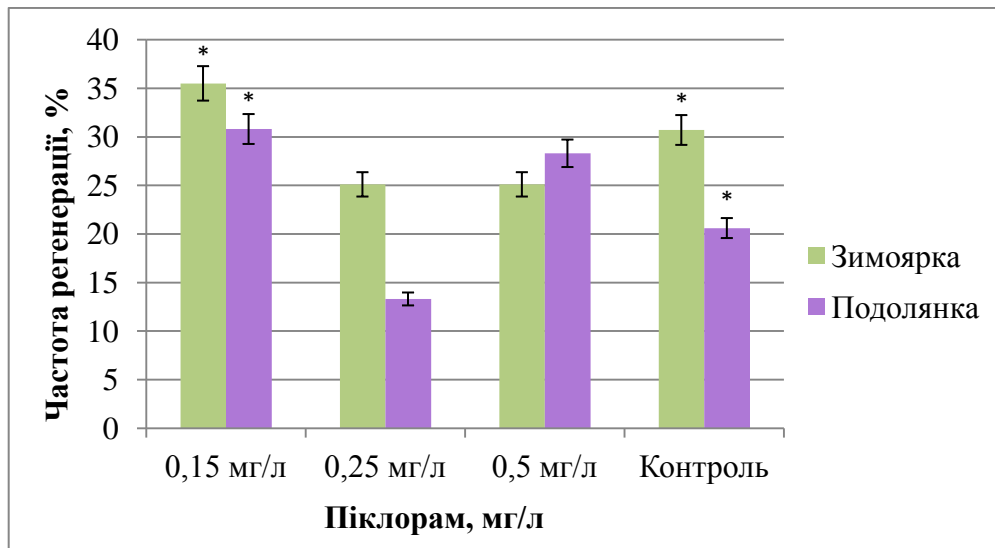


Рис. 3.6. Частота регенерації пагонів із калюсу на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями піклорау в поєднанні з 0,5 мг/л БАП.

*Примітка:* Контроль – модифіковане живильне середовище для регенерації МСК2; \* $p \leq 0,05$ .

Збільшення концентрації піклорау до 0,25 мг/л та 0,5 мг/л (середовища МСР5 та МСР6, табл. 3.1) зумовило зменшення кількості морфогенних зон порівняно з нижчою концентрацією. Також спостерігався некроз калюсу та зниження регенераційної активності. Таким чином, підвищення концентрації піклорау в регенераційному середовищі загалом негативно впливає на морфогенетичну здатність калюсу та регенерацію пагонів у пшениці.

Для підтвердження позитивного ефекту вибраної концентрації піклорау (0,15 мг/л) у поєднанні з 0,5 мг/л БАП досліджували здатність до морфогенезу не тільки «молодого» (18-добового) калюсу, а й «старого» (30-добового). У 30-добового калюсу відбувалося активне утворення меристематичних зон, проте частота регенерації була нижчою порівняно з 18-добовим калюсом (рис. 3.7).

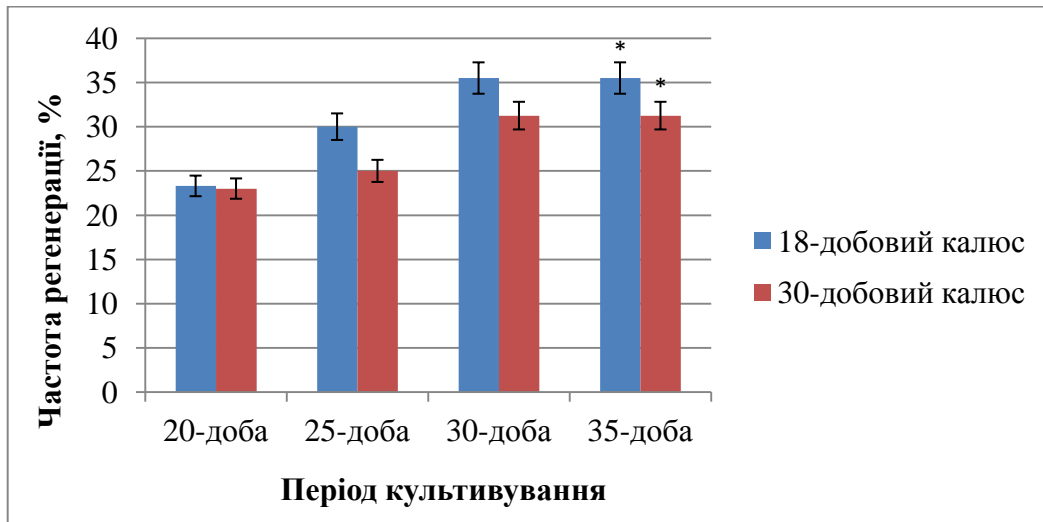


Рис. 3.7. Частота утворення регенерантів з 18- і 30-добового калюсу на середовищі МСР4.

Примітка: \* $p \leq 0,05$ .

Опираючись на наведені вище дані встановлено, що найефективнішим виявилось регенераційне середовище МСР4 (табл. 3.1).

Окрім активного утворення меристематичних осередків, регенерації пагонів та коренів на зазначеному середовищі спостерігали задовільний фізіологічний стан калюсу впродовж усіх етапів експерименту. Важливо, що на пізніх етапах культивування (30–35 днів) ці показники залишалися стабільно високими.

За наявності у живильному середовищі дикамби спостерігали нижчий відсоток регенерації у порівнянні з піклорамом, а також меншу кількість морфогенних зон (табл. 3.2). Значна частина калюсу залишалася неморфогенною, переходячи у стаціонарну фазу росту, та виявляла ознаки старіння.

Отже, для активного утворення морфогенних зон, а також ефективної регенерації пагонів та коренів доцільно використовувати живильне середовище МСР4 (0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам). Саме на цьому середовищі утворюється найбільша кількість рослин-регенерантів, які добре адаптуються до асептичних умов.

Нами показано, що пагони-регенеранти здатні утворювати корені *in vitro* та адаптуватися до септичних умов. Адаптовані рослини-регенеранти за

культивування в умовах захищеного ґрунту виявляли високу життєздатність (понад 75%) і досягли генеративної стадії розвитку (рис. 3.9).

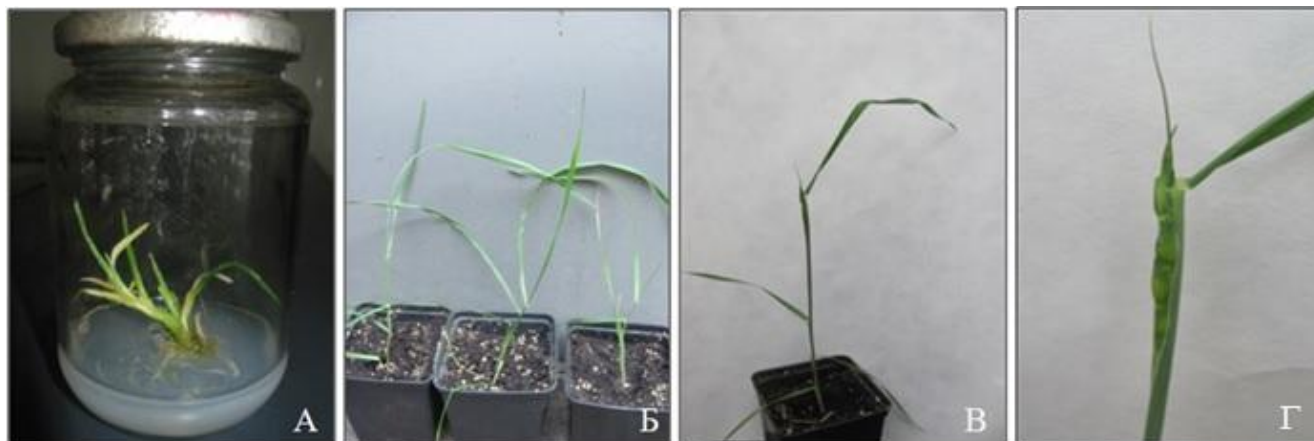


Рис. 3.8. Укорінення (А) та адаптація до ґрунтових умов рослин-регенерантів (Б, В, Г).

Згідно отриманих даних, найвища здатність до морфогенезу властива калюсу з компактною структурою і повільними темпами наростання. Саме такий калюс ми рекомендуємо для біотехнологічних досліджень з метою отримання найбільшого відсотка рослин-регенерантів.

### 3.2. Застосування антибіотиків $\beta$ -лактамної групи для елімінації

#### *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин – складний процес, який залежить від багатьох факторів. Встановлено, що на її ефективність, в основному, впливає генотип рослини, тип експланта, генетичний вектор, бактеріальний штам, оптична щільність бактеріальної суспензії, час витримування експлантів у бактеріальній суспензії та подальшого спільного культивування, склад живильного середовища, тощо [233]. Також успішна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація неможлива без ефективною елімінації бактеріальних клітин.

З метою усунення агробактеріальної контамінації використовують різні антибіотики [234-235]. Відомо, що антибіотики, присутні у живильному

середовищі, впливають на регенерацію з експлантів, культивованих *in vitro*. Їх вплив може бути негативним або позитивним [236].

Чутливість рослин до антибіотиків є видоспецифічною і залежить, в основному, від типу та концентрації антибіотика, типу експланта та умов культивування. Тому, перш ніж їх застосовувати для запобігання чи усунення небажаних мікроорганізмів, необхідно визначити тип і концентрацію антибіотика з найменшим фітотоксичним впливом на рослинні клітини. Як правило, препарати  $\beta$ -лактамної групи вважаються нетоксичними для клітин рослин через їх специфічну дію на бактерії [237], але в деяких випадках продукти розпаду цих антибіотиків у живильному середовищі можуть по-різному впливати на ріст рослинної клітини. Таким чином, їх фітотоксичність може значно варіювати залежно від концентрації антибіотику та виду рослин [238-239].

Багато, щоб антибіотик був стабільним, не залежав від рН і не взаємодіяв з компонентами регенераційного середовища, не спричиняв побічних ефектів, не чинив токсичного впливу на рослинний організм, а також був відносно дешевим.

Досить часто для елімінації агробактеріальних клітин використовують антибіотики  $\beta$ -лактамної групи [240-241]. Вони викликають лізис бактерій шляхом специфічного втручання в біосинтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій: інгібують ферменти транспептидазу та карбоксипептидазу (пеніцилін-зв'язуючі білки (PBPs)), які каталізують реакції синтезу пептидоглікану [239, 242-243]. Рослинні клітини не мають жодних відомих мішеней для  $\beta$ -лактамів, однак дані речовини можуть впливати як позитивно, так і негативно на органогенез чи ембріогенез [244]. Найбільш важливими представниками  $\beta$ -лактамів є карбеніцилін, який відноситься до класу пеніцилінів, та цефотаксим, що належить до цефалоспоринів (рис. 3.9). Останній активно застосовують в якості ефективного антибіотика для інгібування росту агробактеріальних клітин, оскільки він має мінімальний токсичний ефект на більшість рослин та характеризується широким спектром дії на грампозитивні та грамнегативні бактерії (рис. 3.9А) [245].

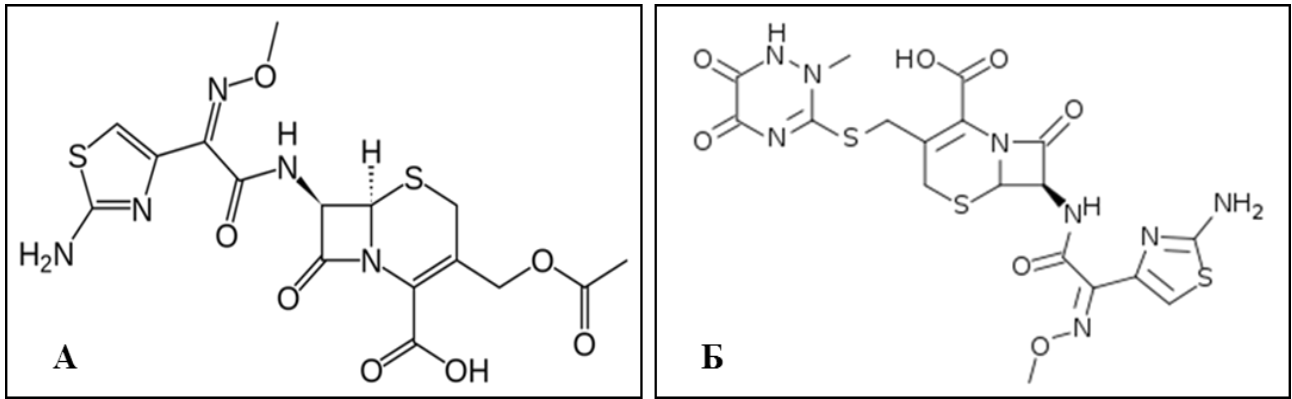


Рис. 3.9. Структурна формула антибіотиків цефотаксиму (А) і цефтриаксону (Б).

Низька концентрація цефотаксиму підвищує регенерацію пагонів у кукурудзи [246], пшениці [247-248], яблуні [249] тощо, а підвищення концентрації знижує ефективність утворення пагонів у зазначених культур, негативно впливає на регенерацію трансформованих експлантатів і ріст пагонів у томатів [250-251]. Численні дослідження підтверджують негативний вплив високих концентрацій цефотаксиму (300 мг/л і вище) на органогенез, ембріогенез та регенерацію пагонів більшості видів рослин [243, 252]. У  $\beta$ -лактамі кільці та бічному ланцюзі цефотаксим містить 6-амінопеніциланову, фенілоцтову та фенілмалонову кислоти. Саме завдяки такій структурі забезпечується біологічна активність цього антибіотика у рослинах, яка призводить до втрати балансу фітогормонів при високій концентрації даного антибіотика і, як наслідок, зниження ефективності трансформації, регенерації трансформованих експлантатів і росту пагонів [241, 250-251]. З огляду на це, постає питання заміни цефотаксиму антибіотиками, які забезпечують ефективну елімінацію *A. tumefaciens* під час генетичної трансформації *in vitro* та водночас не знижують, а бажано підвищують частоту регенерації з трансформованих експлантів.

Як альтернативу цефотаксиму можна розглядати антибіотики тиментин та цефтриаксон. Тиментин складається з пеніцилінового похідного тикарциліну та клавуланової кислоти. Він характеризується високим ступенем інгібування *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, що тиментин підвищує органогенез з листових експлантів *N. tabacum* [244] і сім'ядольних експлантів у томатів [253],

однак пригнічує калюсогенез у полуниці [235]. Cheng та співавтори зазначають, що тиментин можна розглядати як альтернативний антибіотик для тих видів, в яких карбеніцилін і цефотаксим негативно впливають на регенерацію [254]. Досі вплив тиментину на регенераційні процеси в м'якої пшениці не вивчали.

Іншим антибіотиком, який можна успішно застосовувати в якості інгібітора *A. tumefaciens* є цефтриаксон [252]. Він належить до цефалоспоринів четвертого покоління широкого спектру дії та характеризується тривалим періодом напіврозпаду. Структурно він має С-3 бічний ланцюг, що складається з тiazолідиндіонів, які мають кислотні властивості (рис. 3.9Б). В організмі людини даний антибіотик викликає часткове пошкодження печінки за рахунок транзйєтного підвищення загального білірубину, холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїнів низької щільності, а також зниження альбуміну, що веде до холестатичних аномалій [256-259].

На даний час антибіотик цефтриаксон використовують для елімінації *A. tumefaciens* підчас генетичної трансформації для таких видів, як *Achyranthes bidentata* [260], *Lactuca sativa* [261], однак його вплив на морфогенетичні процеси у пшениці не встановлено.

Оскільки вплив тиментину і цефтриаксону на регенераційні процеси в м'якої пшениці раніше не вивчали, тому одним із завдань нашої роботи було визначення елімінуючої *Agrobacterium tumefaciens* концентрації даних антибіотиків та встановлення їх впливу на регенерацію *in vitro* пагонів м'якої пшениці сортів Зимоярка та Подолянка.

Порівнювали інгібуючий ефект антибіотиків цефотаксиму, тиментину та цефтриаксону на клітини *Agrobacterium tumefaciens* штамів АВІ та GV3101. Відомо, що тиментин повністю пригнічує ріст *Agrobacterium* штамів: ЕНА 105 за концентрації 250 мг/л [262] або 400 мг/л [263]; С58 – у концентрації 250 мг/л [238]; LBA4404 – у концентрації 150 мг/л [264] або 400 мг/л [250]; KYRT1 – за концентрації 50 мг/л [234]; GV3101 – у концентрації 200 мг/л [262]. Цефтриаксон ефективно елімінує *A. tumefaciens* таких штамів, як: LBA4404 та ЕНА105 у

концентрації 200 мг/л або 500 мг/л [243, 262], GV3101 – у концентрації 300, 400 або 500 мг/л [261], а цефотаксим – 500 мг/л.

Для встановлення елімінуючих агробактерії концентрацій антибіотиків використовували метод дисків та серійного розведення (розділ 2). Оптичну щільність ( $OD_{600}$ ) бактеріальної суспензії обох штамів доводили до 0,4 (оптимальна концентрація агробактерій, що використовується під час трансформації пшениці *in vitro*), що відповідає  $2,1 \times 10^9$  КУО/мл для штаму АВІ та  $1,1 \times 10^9$  КУО/мл для штаму GV3101. При такій концентрації клітин *A. tumefaciens* відбувається перенесення Т-ДНК у геном рослин.

Нами встановлено, що зона пригнічення діаметром 12,5 мм для штаму АВІ та 10,5 мм для штаму GV3101 спостерігається під час використання розчину концентрацією 350 мг/л тиментину, 400 мг/л цефтриаксону та 500 мг/л цефотаксиму (табл. 3.3, 3.4, рис. 3.10).

Таблиця 3.3

Зони інгібування *A. tumefaciens* штаму АВІ за використання антибіотиків тиментину, цефтриаксону і цефотаксиму

Концентрація	Антибіотики		
	Цефотаксим	Тиментин	Цефтриаксон
100 мг/л	9,0 ± 0,3 мм	8,5 ± 0,8 мм	8,0 ± 0,6 мм
150 мг/л	9,0 ± 0,5 мм	10,5 ± 0,5 мм	9,5 ± 0,3 мм
200 мг/л	9,8 ± 0,7 мм	11,0 ± 0,5 мм	10,0 ± 0,5 мм
250 мг/л	10,0 ± 0,3 мм	11,0 ± 0,5 мм	10,5 ± 0,5 мм
300 мг/л	10,5 ± 0,5 мм	11,5 ± 0,5 мм	11,0 ± 0,7 мм
350 мг/л	11,0 ± 0,6 мм	<b>12,5 ± 0,3 мм</b>	11,5 ± 0,4 мм
400 мг/л	11,6 ± 0,4 мм	13,5 ± 0,3 мм	<b>12,5 ± 0,4 мм</b>
450 мг/л	12,0 ± 0,5 мм	14,0 ± 0,4 мм	13,5 ± 0,4 мм
500 мг/л	<b>12,5 ± 0,5 мм</b>	16,0 ± 0,6 мм	17,5 ± 0,4 мм

Зони інгібування *A. tumefaciens* штаму GV3101 за використання антибіотиків тиментину, цефтриаксону і цефотаксиму

Концентрація	Антибіотики		
	Цефотаксим	Тиментин	Цефтриаксон
100 мг/л	7,5±0,6 мм	8,0±0,5 мм	6,5±0,5 мм
150 мг/л	8,0±0,5 мм	9,0±0,5 мм	7,0±0,8 мм
200 мг/л	8,0±0,5 мм	9,5±0,3 мм	7,5±0,5 мм
250 мг/л	8,5±0,4 мм	10,0±0,5 мм	8,0±0,3 мм
300 мг/л	9,0±0,3 мм	10,3±0,3 мм	8,8±0,2 мм
350 мг/л	9,5±0,5 мм	<b>10,5±0,5 мм</b>	9,6±0,6 мм
400 мг/л	10,0±0,7 мм	10,5±0,7 мм	<b>10,0±0,8 мм</b>
450 мг/л	10,0±0,5 мм	11,0±0,5 мм	11,6±0,5 мм
500 мг/л	<b>10,5±0,4 мм</b>	11,5±0,4 мм	13,2±0,7 мм

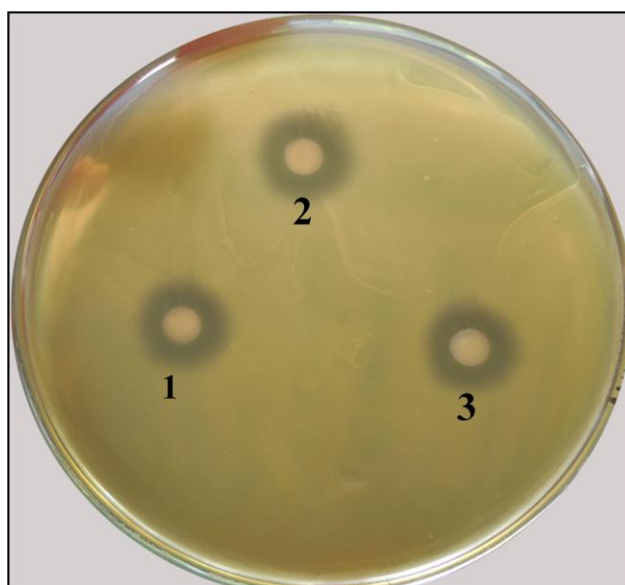


Рис. 3.10. Зони інгібування бактеріальних клітин досліджуваними антибіотиками: 1 – 350 мг/л тиментину, 2 – 400 мг/л цефтриаксону, 3 – 500 мг/л цефотаксиму.

За допомогою методу серійного розведення визначено, що під час застосування елімінуючих концентрацій вибраних антибіотиків кількість живих бактеріальних клітин для штаму АВІ становить  $1,5-1,7 \times 10^3$  КУО/мл, а для GV3101

–  $1,7 \times 10^3$  КУО/мл. При такій концентрації клітин *A. tumefaciens* бактеріальної контамінації рослинного матеріалу не спостерігається.

Таким чином, тиментин і цефтриаксон більш ефективно пригнічують ріст агробактерії порівняно з цефотаксимом. При збільшенні концентрації антибіотиків збільшується зона інгібування *A. tumefaciens* [255, 265].

### **3.3. Вплив антибіотиків на частоту утворення морфогенного калюсу, регенерацію пагонів та ризогенез пшениці**

Механізм дії антибіотиків на рослинний організм достеменно не відомий, проте існує припущення, що антибіотики імітують рослинні регулятори росту, оскільки деякі з них мають ауксиноподібну структуру [237]. Стимулюючий вплив низьких концентрацій цефотаксиму на морфогенез і регенерацію було показано для калюсних культур кукурудзи [246], індійського рису [266], м'яти перцевої [267], а також пшениці [248]. Однак, за останніми даними підвищення концентрації (до 250 мг/л) даного антибіотика підвищує частоту утворення пагонів у пшениці [268].

Тиментин (300 мг/л) вважається ефективним, не лише для елімінації *A. tumefaciens* під час генетичної трансформації томатів, а й для стимулювання регенераційних процесів [253].

Одним із завдань нашої роботи було дослідити дію різних (від низьких до високих) концентрацій тиментину та цефтриаксону на регенерацію з калюсу пшениці та встановити можливість використання антибіотиків в якості додаткових регуляторів росту подібно до дикамби та піклораму. Вплив цефтриаксону та тиментину на морфогенетичні процеси та регенерацію пагонів з калюсу пшениці м'якої нами досліджено вперше.

Нами встановлено, що 350 мг/л тиментину у культуральному середовищі дещо пригнічують утворення морфогенного калюсу для обох сортів (табл. 3.5, 3.6, 3.7, рис. 3.11), але частота утворення меристематичних осередків залишається вищою порівняно з контролем (середовище МСР4), що свідчить про позитивний ефект застосування тиментину. За наявності у живильному середовищі 300 мг/л

тиментину спостерігається максимальний відсоток утворення морфогенного калюсу для сортів Зиморяка ( $99,1 \pm 1,5\%$ ) та Подолянка ( $97,6 \pm 1,3\%$ ) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вплив антибіотику тиментину на частоту утворення морфогенного калюсу і регенерацію пагонів пшениці м'якої

Концентрація тиментину, мг/л	сорт Зиморяка			сорт Подолянка		
	Частота, %			Частота, %		
	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація
25	95,6±2,5	75,4±4,7	18,9±1,0	93,8±1,2	55,1±2,1	35,4±0,5
50	95,9±2,0	60,9±4,2	19,5±0,5	93,6±0,5	68,0±2,2	34,1±0,5
75	93,0±0,9	76,8±3,4	8,2±1,2	94,3±1,8	74,9±3,7	22,9±1,6
100	91,2±4,1	82,6±3,2	16,4±2,3	96,5±0,6	76,6±2,5	22,7±2,0
125	91,0±2,0	59,2±4,5	22,9±0,2	93,3±1,8	64,6±2,4	23,1±1,7
150	92,4±3,6	60,5±2,4	19,3±0,7	91,2±0,9	62,1±5,6	22,8±1,2
175	94,2±1,1	63,2±4,8	21,2±0,4	90,7±1,9	69,8±3,6	23,0±0,5
200	97,8±2,1	75,8±3,1	13,3±0,4	90,5±0,9	66,4±1,8	21,4±1,3
225	87,1±3,1	56,9±3,6	17,7±0,7	91,0±2,4	73,0±3,3	19,1±1,3
250	95,7±4,0	54,6±1,3	19,8±1,4	94,1±1,5	53,1±2,7	24,4±1,3
275	93,1±3,9	54,4±2,1	21,8±1,0	93,3±0,3	57,1±2,7	26,3±0,1
300	99,1±1,5	62,6±4,4	22,1±1,5	97,6±1,3	50,6±4,4	22,0±1,6
325	93,8±2,8	63,1±1,9	29,1±1,6	92,9±0,6	61,6±1,8	25,8±0,4
350	88,9±0,6	72,9±2,6	32,8±1,2	95,0±2,0	48,0±2,1	19,2±1,6
375	92,3±2,8	57,5±2,0	29,6±0,9	91,6±2,5	67,0±3,2	24,3±0,4
400	80,1±1,8	48,1±2,3	24,3±1,2	97,3±0,4	42,3±1,6	24,2±1,1
425	92,6±1,8	67,8±2,2	27,7±1,1	87,3±1,4	59,2±3,6	24,5±0,3
450	91,5±2,3	61,6±2,5	18,8±0,6	90,7±4,4	60,6±1,7	22,5±0,4
475	90,8±1,3	75,1±4,1	13,3±0,9	89,6±0,4	59,1±4,0	18,9±1,0
500	90,0±1,9	65,0±2,5	11,3±0,5	91,3±1,4	59,5±4,2	14,5±0,9
<b>Контроль</b>	<b>76,5±1,6</b>	<b>75,7±1,7</b>	<b>26,5±1,6</b>	<b>55,8±1,6</b>	<b>31,0±1,8</b>	<b>25,5±2,4</b>

Примітка: Тут і далі  $p \leq 0,05$ . Наведені середні арифметичні дані.

Частота утворення меристематичних осередків за наявності у культуральному середовищі 325 мг/л цефтриаксону для сорту Зимоярка була найвищою, мінімальна кількість морфогенного калюсу утворювалася за концентрації 400 мг/л цефтриаксону (табл. 3.5, 3.6, 3.7, рис. 3.12А). У випадку сорту Подолянка максимальний відсоток утворення морфогенних зон спостерігається при внесенні у живильне середовище 350 мг/л цефтриаксону, а мінімальний за 75 мг/л (табл. 3.5, 3.7, рис. 3.12Б). Однак, проведений аналіз свідчить про те, що утворення меристематичних зон у пшениці не залежить від наявності та концентрації у живильному середовищі антибіотика, а носить лише генотип-залежний характер (рис. 3.11, 3.12).

Рівень статистичної значимості у тесті Ст'юдента для двох генотипів пшениці (Зимоярка та Подолянка)

Концентрація мг/л	Рівень значимості					
	Цефтриаксон			Тиментин		
	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація
25	0,83563	0,530965	0,029457*	0,60025	0,103899	0,000253**
50	0,74287	0,722268	0,003824*	0,92724	0,757148	0,000005**
75	0,82675	0,719060	0,050208	0,53605	0,987151	0,000263**
100	0,27895	0,200185	0,002128*	0,12085	0,824931	0,028486*
125	0,79093	0,404230	0,042717*	0,20113	0,794285	0,844130
150	0,08097	0,906030	0,000334**	0,34597	0,976258	0,016435*
175	0,79811	0,728662	0,001644*	0,33308	0,795520	0,008010*
200	0,64278	0,159722	0,074376	0,08360	0,431890	0,002900*
225	0,48981	0,814866	0,000206**	0,17453	0,260575	0,208382
250	0,85382	0,099633	0,007842*	0,54468	0,895801	0,017909*
275	0,51219	0,813389	0,000197**	0,93069	0,806960	0,016300*
300	0,75488	0,784108	0,002055*	0,46804	0,522973	0,919106
325	0,99119	0,909815	0,002335*	0,78145	0,912362	0,062352
350	0,07533	0,874544	0,022494*	0,14596	0,207452	0,000909**
375	0,91176	0,711507	0,012441*	0,76047	0,396254	0,002479*
400	0,30438	0,517675	0,010265*	0,23138	0,759052	0,923080
425	н/о	н/о	н/о	0,17636	0,421984	0,034589*
450	н/о	н/о	н/о	0,93055	0,904779	0,003397*
475	н/о	н/о	н/о	0,66183	0,835135	0,002243*
500	н/о	н/о	н/о	0,63085	0,673769	0,010538*
<b>Контроль</b>	<b>0,26891</b>	<b>0,019185</b>	<b>0,774374</b>	<b>0,26891</b>	<b>0,019185</b>	<b>0,774374</b>

Примітка: н/о – не обчислено; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,001$ .

Вплив антибіотику цефтриаксону на частоту утворення морфогенного калюсу і регенерацію пагонів пшениці м'якої

Концентрація цефтриаксону, мг/л	сорт Зимоярка			сорт Подолянка		
	Частота, %			Частота, %		
	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація
25	71,8±1,3	53,5±2,4	58,5±1,8	72,6±1,2	65,8±1,8	30,1±4,2
50	77,6±4,3	58,9±1,5	58,1±3,2	77,8±2,8	67,2±1,1	18,2±3,2
75	70,8±4,0	59,3±4,0	43,1±3,6	64,6±1,5	66,4±0,2	19,1±2,1
100	75,8±2,8	38,8±2,6	42,6±3,5	90,1±1,5	77,2±2,2	22,6±3,3
125	96,1±3,5	74,4±1,8	23,2±1,1	96,1±2,7	60,3±1,2	20,8±0,4
150	91,8±4,2	72,3±2,7	29,0±0,2	98,5±2,5	74,9±2,6	16,3±0,6
175	94,7±1,7	72,5±3,4	33,0±0,7	94,1±5,2	66,7±2,3	11,4±1,6
200	72,2±2,2	40,0±1,3	36,1±0,6	77,3±1,6	79,1±4,9	17,5±2,0
225	93,4±3,3	78,9±3,1	37,7±0,8	95,5±4,2	86,3±2,4	12,1±1,1
250	82,7±1,3	66,3±4,2	39,4±0,1	78,6±1,7	40,9±3,8	10,7±0,5
275	97,3±1,1	64,5±4,8	36,3±1,3	92,7±0,6	65,9±4,0	16,7±1,5
300	85,0±1,2	50,7±3,4	41,2±1,3	78,0±2,1	43,8±4,8	10,3±3,5
325	97,2±0,1	66,2±2,1	30,0±0,8	95,8±4,1	68,5±4,5	23,3±0,2
350	77,3±4,7	44,7±1,7	16,5±0,3	98,3±0,5	33,5±4,4	36,1±1,7
375	95,0±1,4	74,1±3,2	24,8±0,7	95,8±3,7	70,3±3,5	33,5±2,2
400	70,2±1,9	43,3±4,4	34,1±4,2	91,7±3,0	52,4±4,3	14,3±4,3
425	97,0±1,8	57,4±2,7	24,2±1,8	97,2±2,8	67,0±2,7	19,9±3,6
450	94,4±4,6	55,2±1,0	22,7±4,8	95,6±2,9	50,8±1,4	16,3±1,4
475	94,0±3,0	61,5±1,4	16,5±1,2	91,6±2,8	70,9±4,6	11,6±1,5
500	97,9±2,4	60,2±3,6	13,7±1,1	95,1±2,1	66,9±4,0	11,2±2,6
<b>Контроль</b>	<b>76,6±2,1</b>	<b>75,7±2,7</b>	<b>26,5±1,6</b>	<b>55,8±1,8</b>	<b>31,0±1,6</b>	<b>25,5±2,4</b>

Примітка: Тут і далі  $p \leq 0,05$ . Наведені середні арифметичні значення.

Для побудови графіків залежності частоти утворення морфогенного калюсу, ризогенезу та регенерації використано сплайн та апроксимацію поліномом 5-го ступеня.

На графіках використовуються такі позначення: коло – показані експериментальні дані; трикутник – середні значення для даної концентрації антибіотику; пунктир – сплайн інтерполяція, проведена через середні значення; штрих-пунктиром проведено лінію на рівні середнього значення величини, отриманої на середовищі МСР4 (табл. 2.1) без антибіотику; суцільна (безперервна) лінія – апроксимація поліномом п'ятого ступеню за методом найменших квадратів.

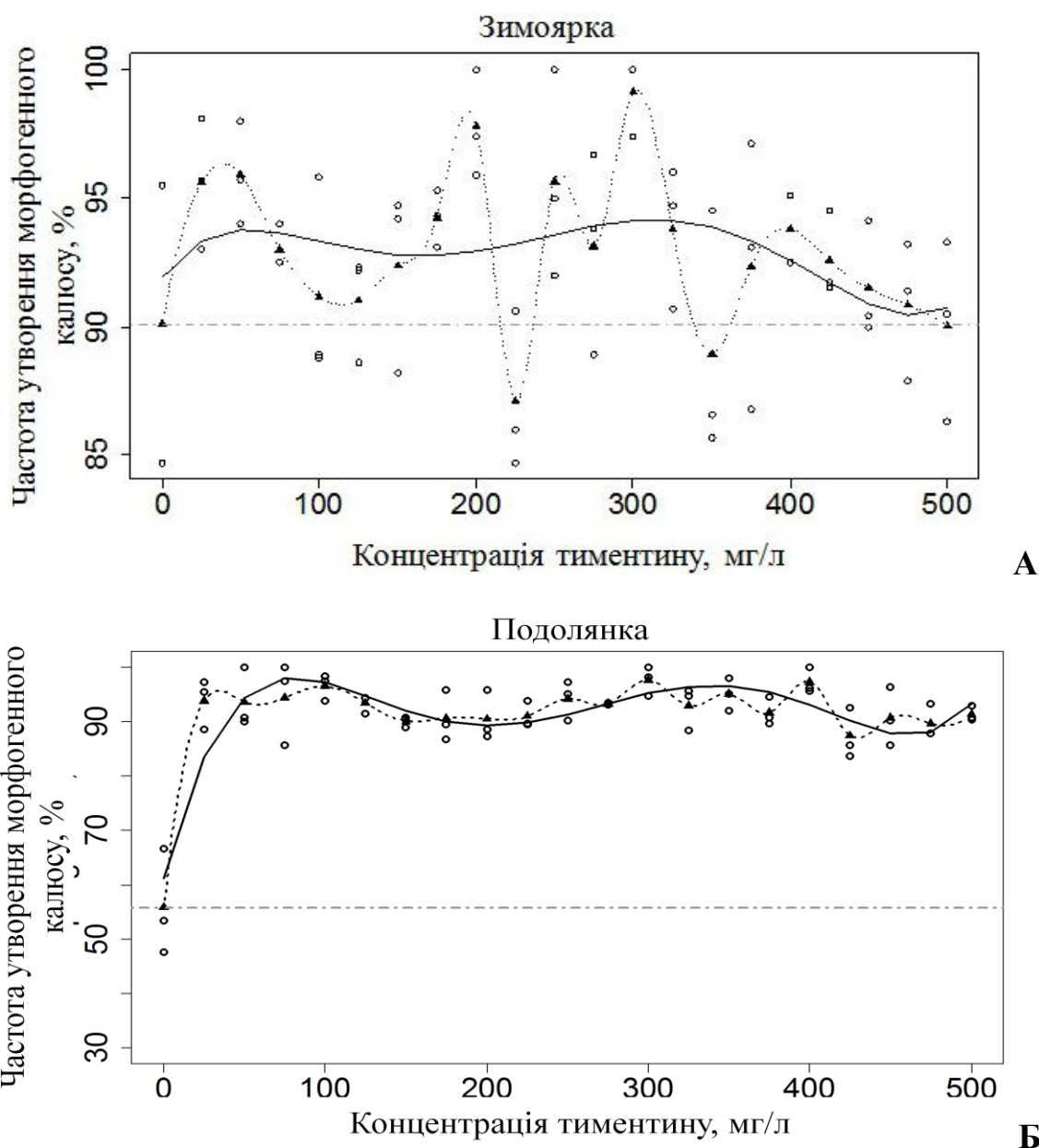


Рис. 3.11. Вплив тиментину на частоту утворення морфогенного калюсу пшениці сортів Зимоярка (А) та Подольанка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .

Методом багатofакторного дисперсійного аналізу показано вплив всіх чотирьох факторів (концентрації антибіотику, його типу, присутності регуляторів росту в середовищі та генотипу) на рівні значимості  $p < 0,001$ .

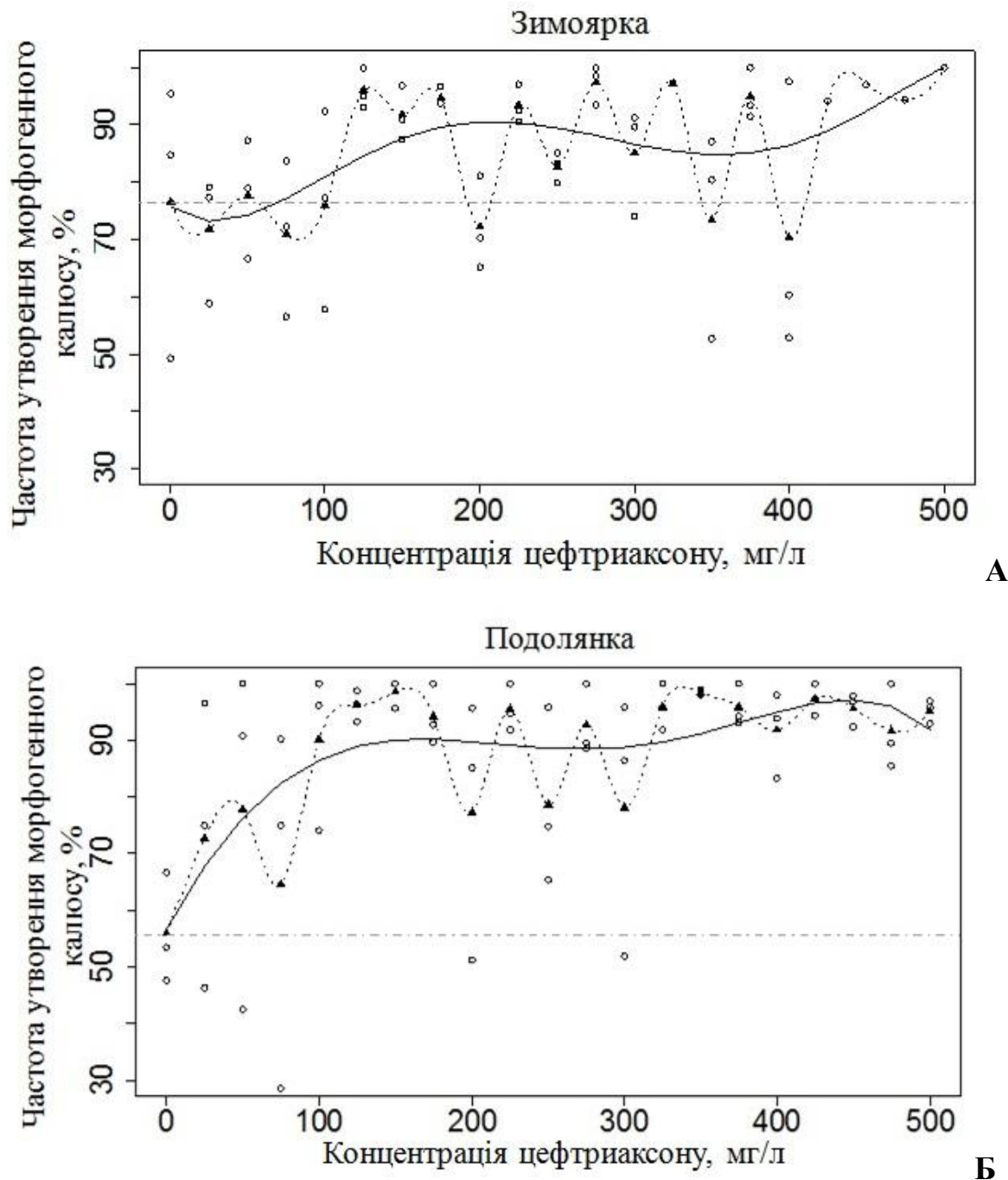


Рис. 3.12. Вплив цефтриаксону на частоту утворення морфогенного калюсу пшениці сортів Зимоярка (А) та Подольанка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .

Також досліджено вплив тиментину та цефтриаксону на частоту утворення пагонів з калюсу пшениці. Розвиток пагонів розпочинався на 2-й тиждень культивування. Зазвичай цефотаксим у малих концентраціях (50-75 мг/л) сприяє регенерації [248], але при додаванні тиментину у регенераційне середовище в концентрації 75 мг/л спостерігалася найменша кількість регенерантів у сорту Зимоярка (табл. 3.4, рис. 3.14А). При додаванні 350 мг тиментину на літр регенераційного середовища МСР4 частота регенерації була вищою, ніж при додаванні інших концентрацій тиментину або за його відсутності (рис. 3.13, 3.14А). Однак, для сорту Подолянка спостерігали протилежний ефект. Найбільше регенерантів ( $\approx 35\%$ ) утворювалося саме при внесенні у живильне середовище мінімальних кількостей даного антибіотика (25 та 50 мг/л), а найменша кількість пагонів (до 14,5%) утворювалась на середовищі, доповненому 500 мг/л тиментину (табл. 3.4., рис. 3.14Б).

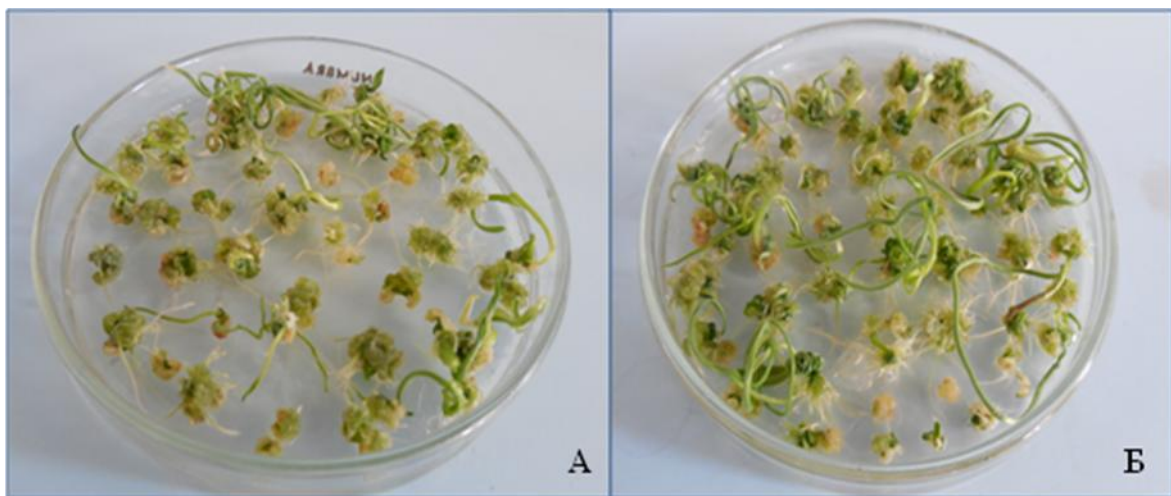


Рис. 3.13. Регенеранти сорту Зимоярка, утворені на живильному регенераційному середовищі: без тиментину – контроль (А) та за його наявності у концентрації 350 мг/л (Б).

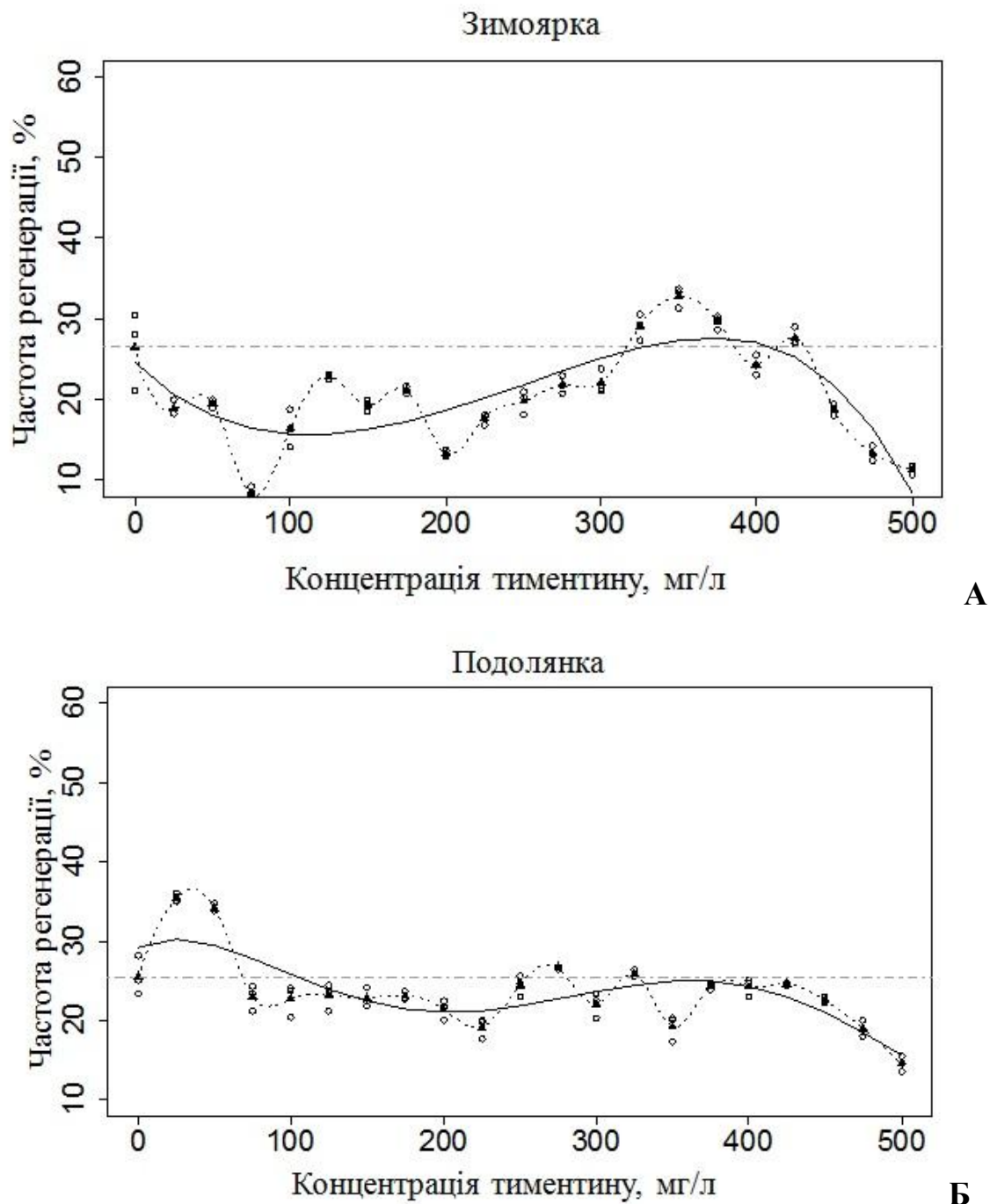


Рис. 3.14. Вплив тиментину на регенерацію пагонів з калюсу пшениці сортів Зимоярка (А) та Подольанка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .

Наявність у живильному середовищі цефтриаксону у концентрації 25 мг/л і 50 мг/л забезпечує максимальний відсоток утворення регенерантів (до 58%) сорту Зимоярка, мінімальна кількість пагонів спостерігається за використання концентрації 350 мг/л (рис. 3.15, 3.16, табл. 3.5). У випадку сорту Подольанка

максимальна частота регенерації спостерігається при внесенні у живильне середовище 350 мг/л цефтриаксону (табл. 3.5, рис. 3.15, 3.18).

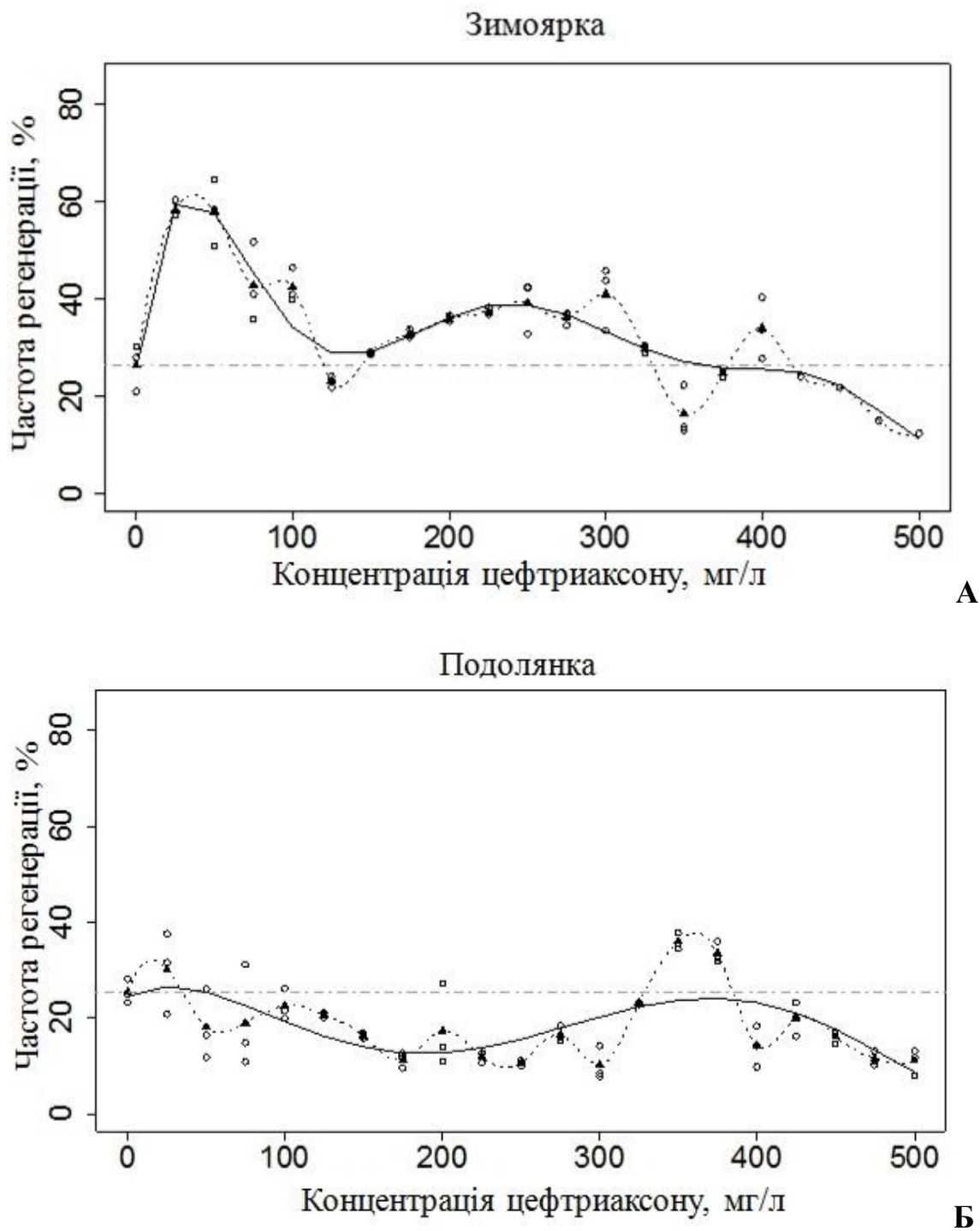


Рис. 3.15. Вплив цефтриаксону на утворення пагонів пшениці сортів Зиморяка (А) та Подольянка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .

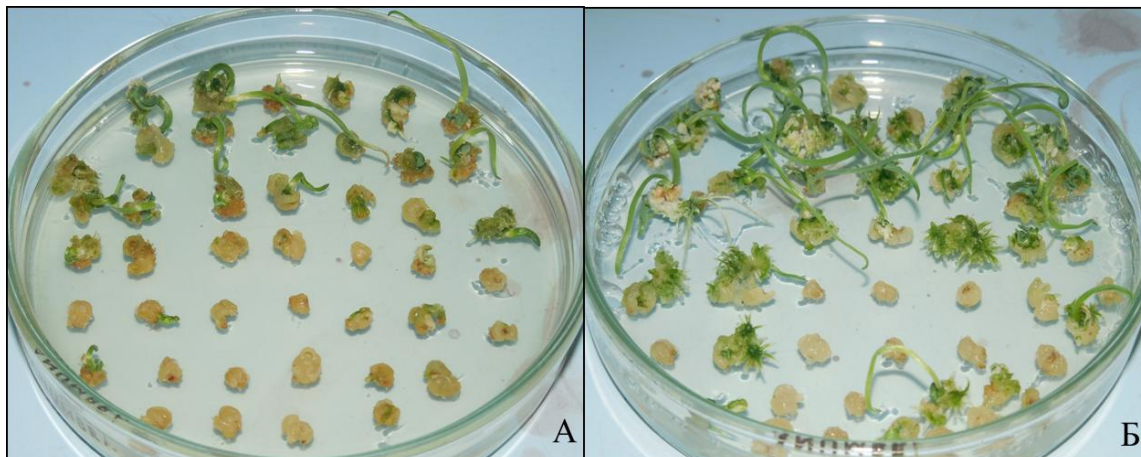


Рис. 3.16. Регенеранти сорту Зимоярка, утворені на живильному регенераційному середовищі: без цефтриаксону – контроль (А) та за його наявності у концентрації 50 мг/л (Б).

Цефтриаксон у концентрації 400 мг/л стимулює утворення пагонів (до 34%) у сорту Зимоярка (табл. 3.5, рис. 3.17). Поряд із цим, дана концентрація забезпечує ефективну елімінацію клітин *A. tumefaciens*.

На основі отриманих даних можна стверджувати, що частота регенерації пшениці залежить від генотипу, типу антибіотика та його концентрації у культуральному середовищі (рис. 3.13, рис. 3.15).

Нами показано, що наявність будь-якої кількості антибіотика цефтриаксону (від низької до великої) стимулює утворення коренів в обох сортів пшениці. Так, за концентрації 100 мг/л тиментину та 225 мг/л цефтриаксону відсоток утворення коренів для сортів Зимоярка та Подолянка був найбільшим (рис. 3.17, 3.18). Крім цього коренеутворення залежить від генотипу. Загалом для сорту Зимоярка спостерігаються значно нижчі показники ризогенезу порівняно із сортом Подолянка (рис. 3.17, 3.18).

На графіках (рис. 3.17, 3.18) вказані частоти регенерації пагонів у кожному досліді, а також показано залежність укорінення від концентрації антибіотика в середовищі ( $p < 0,001$ ). Вплив інших факторів та їх комбінацій був у межах статистичної похибки.

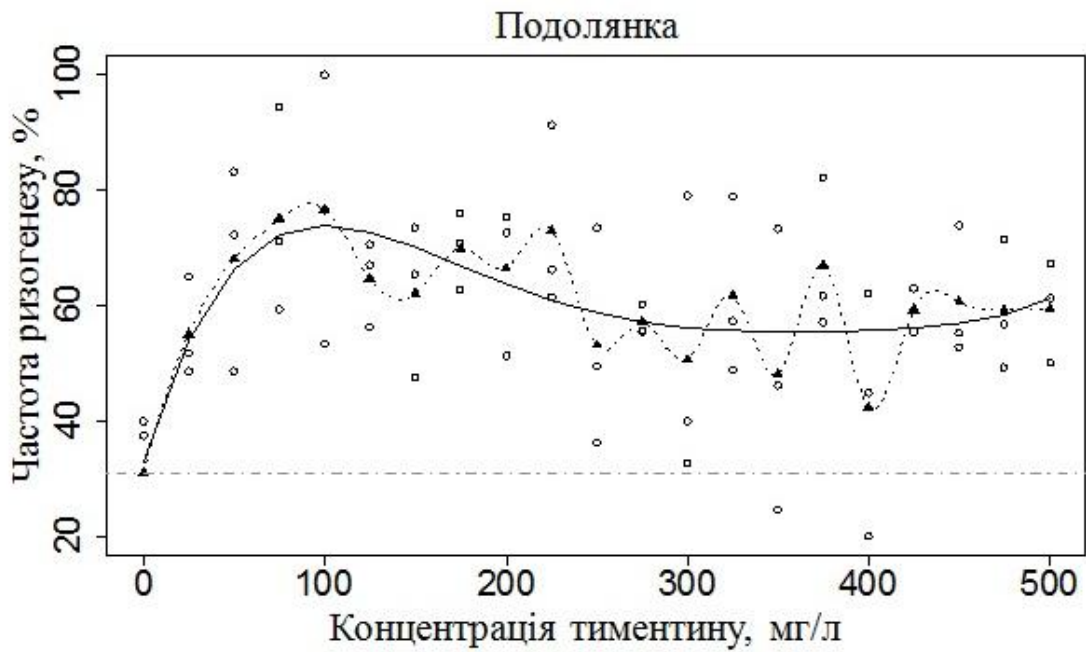
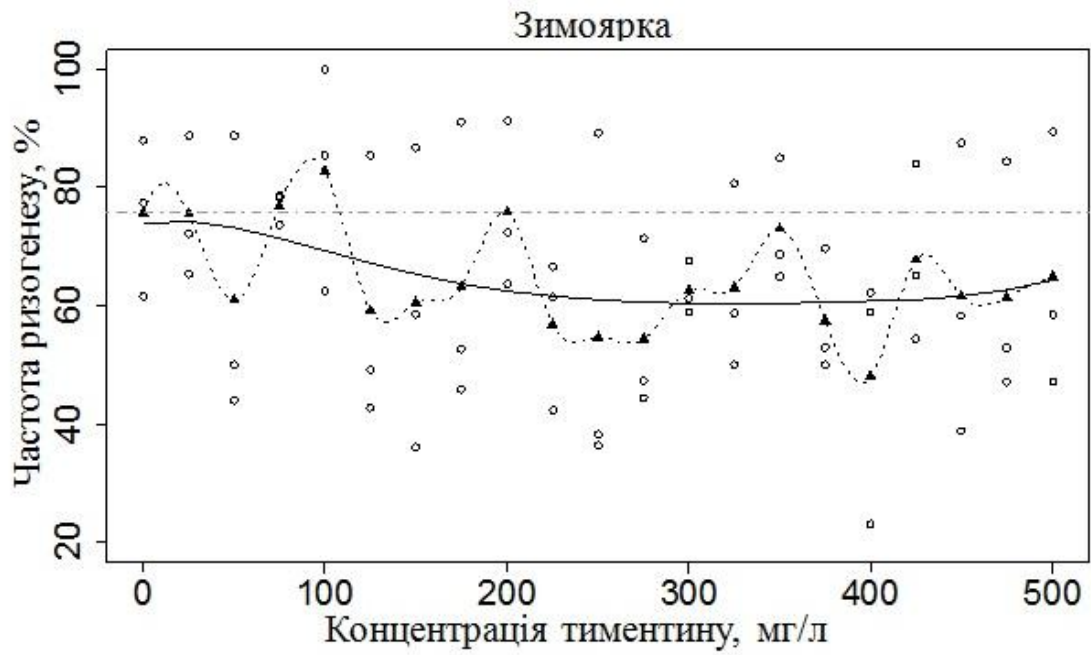
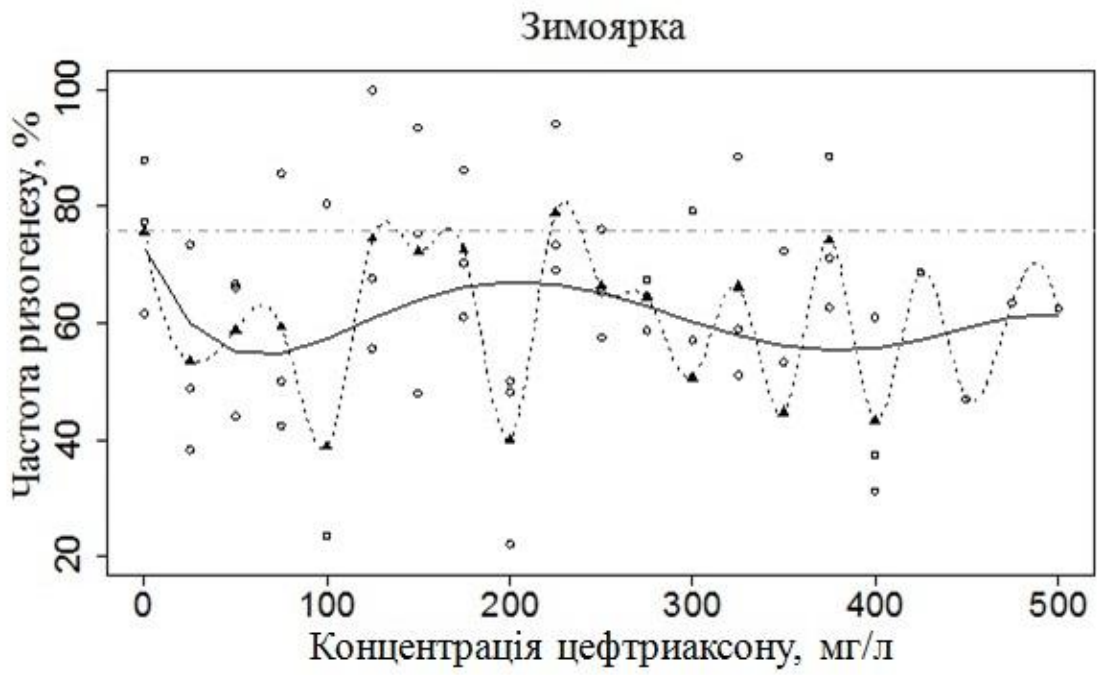
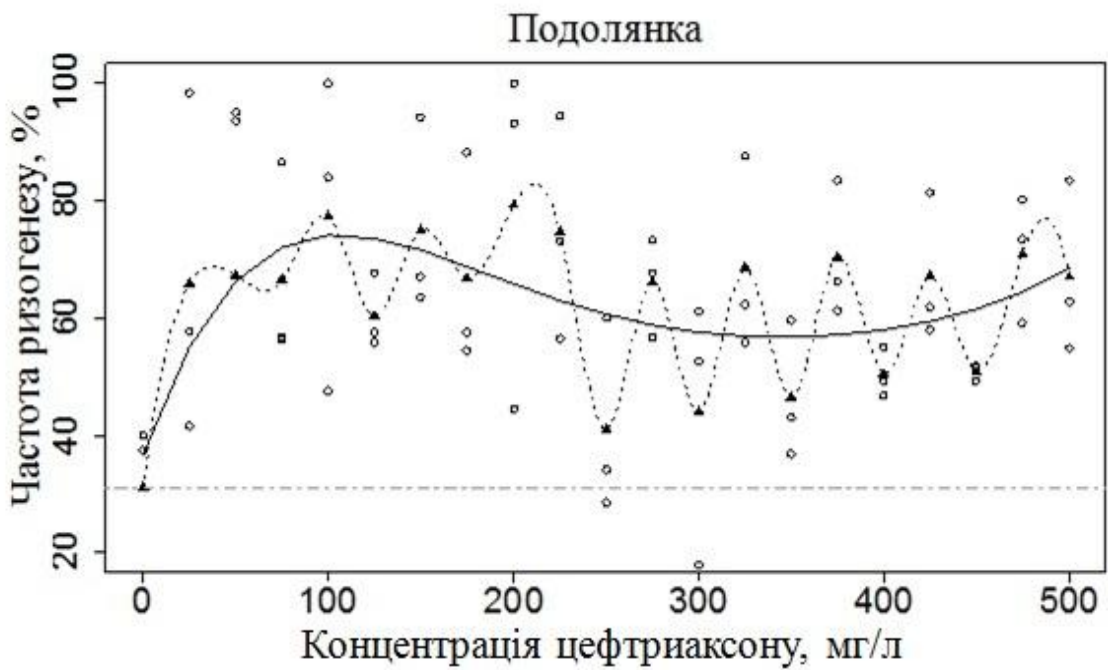


Рис. 3.17. Вплив тиментину на частоту ризогенезу з калюсу пшениці сортів Зимоярка (А) та Подольанка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .



А



Б

Рис. 3.18. Вплив цефтриаксону на частоту ризогенезу з калюсу пшениці сортів Зимоярка (А) та Подолянка (Б).

Примітка:  $p < 0,05$ .

За використання тиментину та цефтриаксону некрозу калюсів і регенерантів не спостерігали. Таким чином, нами встановлено, що при застосуванні

елімінуючих агробактерії концентрацій тиментину (350 мг/л) та цефтриаксону (400 мг/л) підвищується частота регенерації у пшениці двох генотипів.

За наведеними вище даними антибіотик цефтриаксон є перспективним. Його доцільно застосовувати під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*, оскільки він не лише пригнічує ріст бактеріальних клітин, а й стимулює процеси морфогенезу та підвищує частоту регенерації.

Отримані за наявності у живильному середовищі різних концентрацій тиментину та цефтриаксону регенеранти здатні утворювати корені та активно розвивати надземну частину. Нами показано, що  $51,1 \pm 5,1\%$  всіх рослин переважали контрольні (отримані на середовищі для регенерації МСР4 (табл. 3.1) без додавання антибіотиків) за розмірами та кількістю утворених листків,  $18 \pm 0,6\%$  – характеризувалися меншими розмірами та слабкою кореневою системою, а  $30,2 \pm 4,7\%$  за всіма вище вказаними показниками відповідали контролю (рис. 3.19).

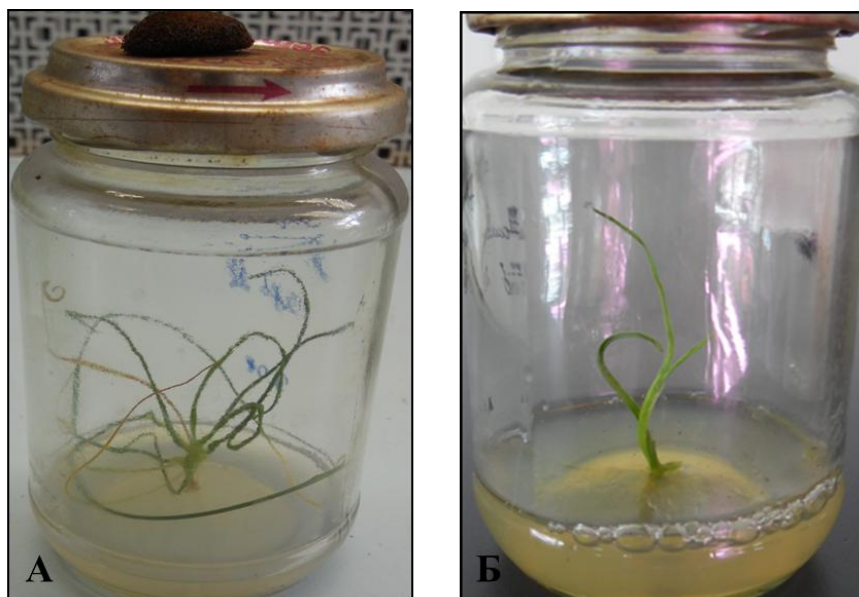


Рис. 3.19. Рослини, отримані на живильному регенераційному середовищі, доповненому тиментином (А) та за його відсутності – контроль (Б).

З метою підтвердження наших спостережень було проведено визначення відносної швидкості росту рослин (RGR-test) [269] для пшениці двох сортів – Зимояра та Подолянка, отриманих на регенераційному середовищі МСР4

(табл. 3.1), доповненому антибіотиком цефтриаксоном. Як контроль було використано рослини, отримані на середовищі МСР4 без антибіотику. Вивчали вплив даного антибіотика на подальший ріст та розвиток отриманих пагонів. Регенеранти із середовища МСР4 переносили на середовище МС (табл. 2.1), яке не містило цефтриаксону та культивували за температури 24 °С та 16-годинного фотоперіоду. На середовище МС переносили і контрольні пагони. Нульовим вважали день, коли у регенерантів з'являвся перший корінь. Кожних 5 днів з моменту появи першого кореня і до 30 доби відбирали по 5 пагонів дослідних і контрольних рослин одного віку та розміру. Вимірювали сиру масу надземної частини регенеранта та окремо коренів. Також вимірювали довжину пагона та коренів.

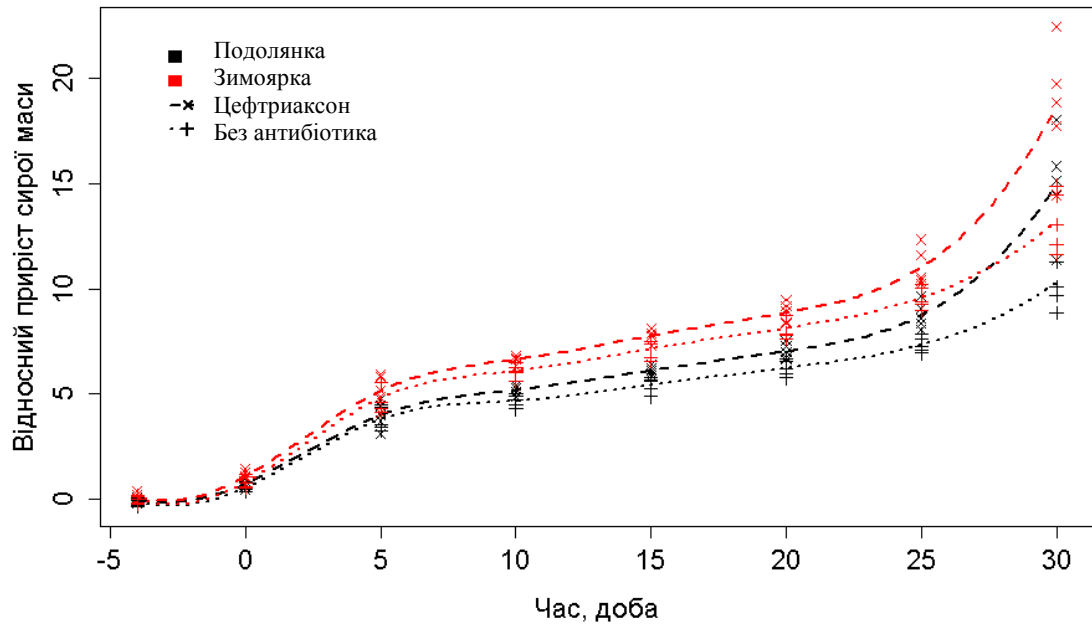
Відносну швидкість росту підраховували за формулою:

$$RI=(x-x_0)/ x_0,$$

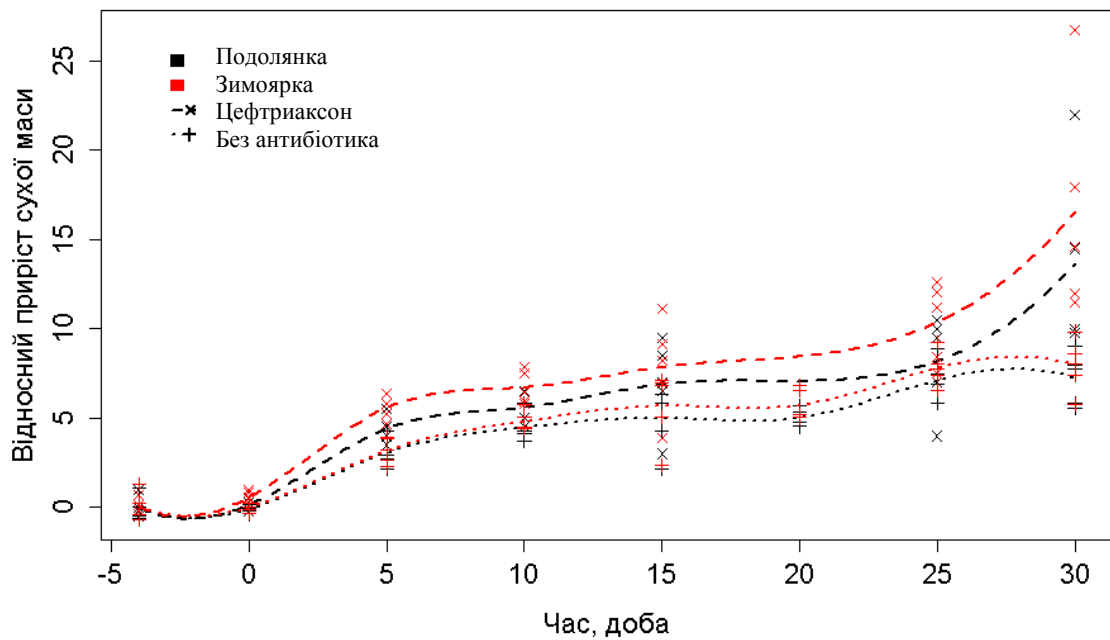
$x$  – середнє значення показника росту (суха чи сира маса кореня або рослини, довжина кореня, висота рослини),

$x_0$  – середнє значення показника на початок експерименту або на день укорінення.

Показано, що дослідні рослини пшениці обох сортів швидше накопичують біомасу у порівнянні з контрольними, інтенсивніше розвивається коренева система (табл. 3.8, 3.9). Залежності показників приросту біомаси від генотипу не спостерігається. В даному випадку значення має лише наявність або відсутність у культуральному середовищі цефтриаксону (рис. 3.20).



**А**



**Б**

Рис. 3.20. Відносний приріст біомаси рослин (А – сира маса рослин, Б – суха маса) пшениці сортів Подолянка та Зимоярка, отриманих на середовищі, доповненому цефтриаксоном.

Примітка:  $p < 0,05$ ; -5 – перенесення регенерантів на середовище MCR2, 0 – поява першого кореня.

Таблиця 3.8

Приріст біомаси рослин сорту Подолянка, отриманих на середовищі з антибіотиком цефтриаксоном

Час/дні	Сира маса рослини, мг		Суха маса рослини, мг		Сира маса кореня, мг		Суха маса кореня, мг		Довжина рослини, см		Довжина кореня, см	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
-5	15,0±2,4	12,3±2,1	2,0±0,3	1,7±0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8±0,5	1,9±1,0	0,0	0,0
0	26,4±3,3	21,4±3,0	2,3±0,6	1,7±1,2	2,0±1,2	1,0±0,8	0,3±0,2	0,2±0,5	5,8±2,9	4,8±2,5	0,7±0,3	0,5±0,6
5	75,2±4,3	65,6±2,7	10,8±1,1	7,7±0,8	9,0±1,4	5,5±1,2	1,3±0,8	1,1±1,1	11,9±3,1	9,4±2,8	5,9±3,0	3,2±2,5
10	92,8±2,3	77,4±1,7	13,2±1,6	10,4±1,2	6,8±2,2	3,5±0,9	1,7±1,5	0,8±1,2	16,4±2,8	12±1,8	4,7±1,7	3,5±1,3
15	106,8±3,6	87,6±2,6	15,8±3,6	11,4±2,1	15,6±1,1	11,6±0,5	2,9±0,4	2,4±0,8	15,3±2,9	11,6±1,6	6,6±3,6	4,7±2,8
20	120,6±2,1	98,4±1,2	14,8±3,5	11,4±2,5	6,7±0,8	5,9±1,2	2,3±1,1	2,1±1,5	21,3±1,9	15,5±1,1	6,3±0,9	5,9±1,4
25	146,2±1,7	113,4±1,3	18,4±2,0	15,4±1,8	4,7±0,9	6,4±1,5	1,7±1,7	1,4±1,3	13,2±1,9	15,4±0,8	5,3±1,2	4,7±1,9
30	239,0±0,7	153,8±1,1	29,3±2,9	15,6±2,3	13,0±1,2	9,7±1,6	3,8±0,4	3,0±0,7	16,0±2,1	17,1±1,8	5,1±3,5	4,8±2,6

Таблиця 3.9

Приріст біомаси рослин сорту Зимоярка, отриманих на середовищі з антибіотиком цефтриаксоном

Час/дні	Сира маса рослини, мг		Суха маса рослини, мг		Сира маса кореня, мг		Суха маса кореня, мг		Довжина рослини, см		Довжина кореня, см	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
-5	13,6±2,0	10,7±2,9	1,9±1,1	1,7±1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7±0,4	2,0±0,6	0,0	0,0
0	26,0±1,5	19,6±2,8	2,8±0,7	1,7±0,4	1,9±1,2	0,8±0,6	0,4±0,2	0,2±0,1	6,1±2,9	5,6±2,6	0,6±0,3	0,6±0,3
5	76,0±3,7	62,4±1,4	11,6±1,4	8,1±1,1	9,4±4,3	4,8±2,3	1,9±0,8	0,9±0,3	12,6±3,1	9,3±2,7	6,0±3,0	3,1±1,3
10	94,0±1,6	76,0±2,1	13,6±2,6	9,7±0,9	6,7±3,1	3,3±1,5	1,7±1,5	0,9±0,5	17,2±2,8	12,2±2,2	4,6±1,7	3,9±1,5
15	107,8±2,2	87,2±1,1	15,6±2,7	11,1±3,3	14,2±1,3	10,8±1,4	3,3±0,3	2,3±0,8	15,7±2,9	11,5±2,5	6,5±3,6	4,4±1,6
20	121,4±2,6	97,8±2,5	11,5±3,5	11,2±1,4	6,6±0,8	5,3±1,7	2,2±1,1	1,8±0,7	21,7±2,2	15,3±1,3	6,4±0,9	5,9±1,4
25	147,8±2,8	113,2±2,1	20,0±3,1	14,6±1,6	5,4±0,9	5,9±1,5	2,0±1,7	1,2±0,7	17,8±1,9	15,3±2,0	5,4±3,9	4,4±2,9
30	241,4±1,4	152,0±2,8	30,8±2,4	14,8±2,5	13,0±1,2	9,3±1,5	4,0±0,3	2,8±0,4	18,7±3,6	18,2±1,5	6,9±3,5	6,8±3,2

Примітка:  $p < 0,05$ , наведено середні значення.

На основі отриманих даних проведено кореляційний аналіз методом найменших квадратів (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Результати кореляційного аналізу та коефіцієнти в рівняннях лінійної апроксимації

Сорт	Антибіотик	Час [-4-10]			Час [10-30]		
		Коефіцієнт кореляції	a	b	Коефіцієнт кореляції	a	b
Подольанка	цефтриаксон	0,905	1,277	0,351	-0,095	4,759	-0,020
Зимоярка	цефтриаксон	0,922	2,599	0,572	0,226	7,216	0,055
Подольанка	-	0,901	0,858	0,276	0,708	2,248	0,105
Зимоярка	-	0,884	1,634	0,363	0,743	3,076	0,159

Примітка:  $y = a + bx$

Крім інтенсивного росту надземної частини рослини-регенеранта спостерігається розвиток і кореневої системи (рис. 3.21). Активне накопичення сирої маси коренів відбувається до 15-ї доби після появи першого кореня на середовищі для вкорінення (рис. 3.21).

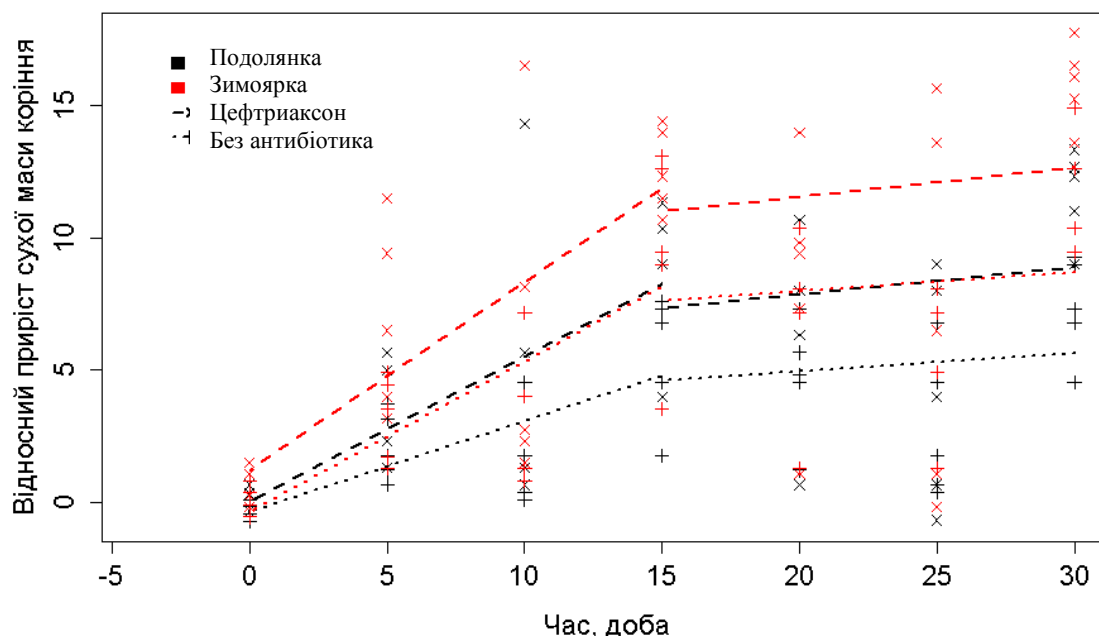


Рис. 3.21. Відносний приріст біомаси коренів рослин пшениці сортів Подолянка та Зимоярка, отриманих на середовищі МСР4.

Примітка:  $p < 0,05$ .

Приріст біомаси кореневої системи залежить від наявності/відсутності антибіотика та генотипу: у сорту Зимоярка ризогенез відбувається інтенсивніше порівняно з сортом Подолянка та контролем (рис. 3.21).

Рослини-регенеранти з розвинутою кореневою системою легше адаптуються до нестерильних умов під час перенесення їх у ґрунт без використання первинних адаптаційних субстратів (наприклад, сфагнового моху [220] та культивування в умовах теплиці за температури 24 °С і природного освітлення (рис. 3.22). У подальшому, пристосовані рослини здатні досягати генеративної стадії розвитку та формувати повноцінне насіння.



Рис. 3.22. Вкорінення та адаптація до нестерильних умов рослин-регенерантів: А, В – отриманих на середовищі без цефтриаксону (контроль); Б, Г – за наявності цефтриаксону (50 мг/л). В, Г – рослини одного віку.

Таким чином, цефтриаксон можна застосовувати як альтернативу цефотаксиму під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* пшениці м'якої *T. aestivum* сортів Зиморяка та Подолянка, оскільки він не лише ефективно усуває бактеріальну контамінацію, а й сприяє підвищенню частоти утворення пагонів, активному формуванню та розвитку кореневої системи у рослин-регенерантів, успішному пристосуванню даних рослин до нестерильних умов. Попри це, для сорту Подолянка даний антибіотик можна використовувати як додатковий стимулятор регенераційних процесів, оскільки ефективна для формування пагонів концентрація (25 мг/л) не пригнічує ріст клітин *A. tumefaciens*, однак підвищує частоту утворення регенерантів.

### 3.4. Вплив антибіотика цефтриаксону на морфологію калюсу і регенерацію пагонів пшениці сортів Зиморяка та Подолянка

Виявлено, що цефтриаксон позитивно впливає на регенерацію пагонів у пшениці м'якої *T. aestivum*. Проведено гістологічний аналіз формування регенерантів під впливом цього антибіотика.

Встановлено, що меристеми, виділені із трьохдобових проростків пшениці сортів Зиморяка та Подолянка, представлені апікальною центральною меристемою та кількома периферичними листками обгортки, які повністю складаються з клітин, що активно діляться (рис. 3.23).

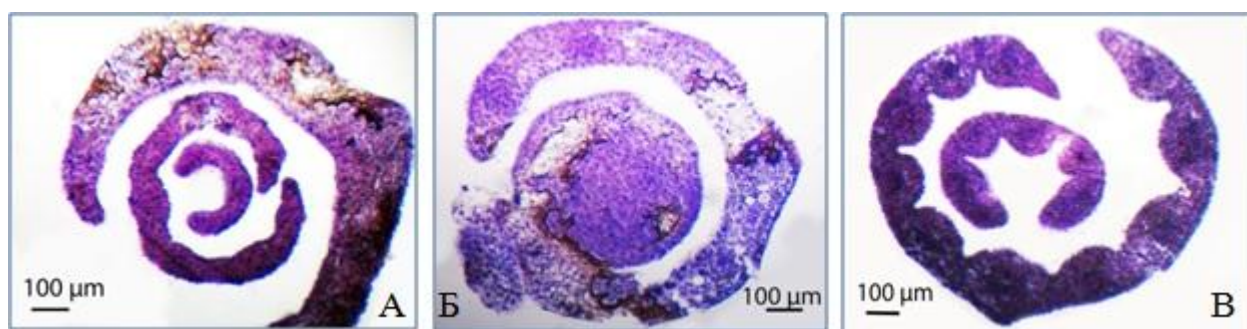


Рис. 3.23. Поперечний переріз меристем, виділених із тридобових проростків: А – сорт Подолянка, апікальна частина, Б – сорт Подолянка, базальна частина, В – сорт Зиморяка, апікальна частина.

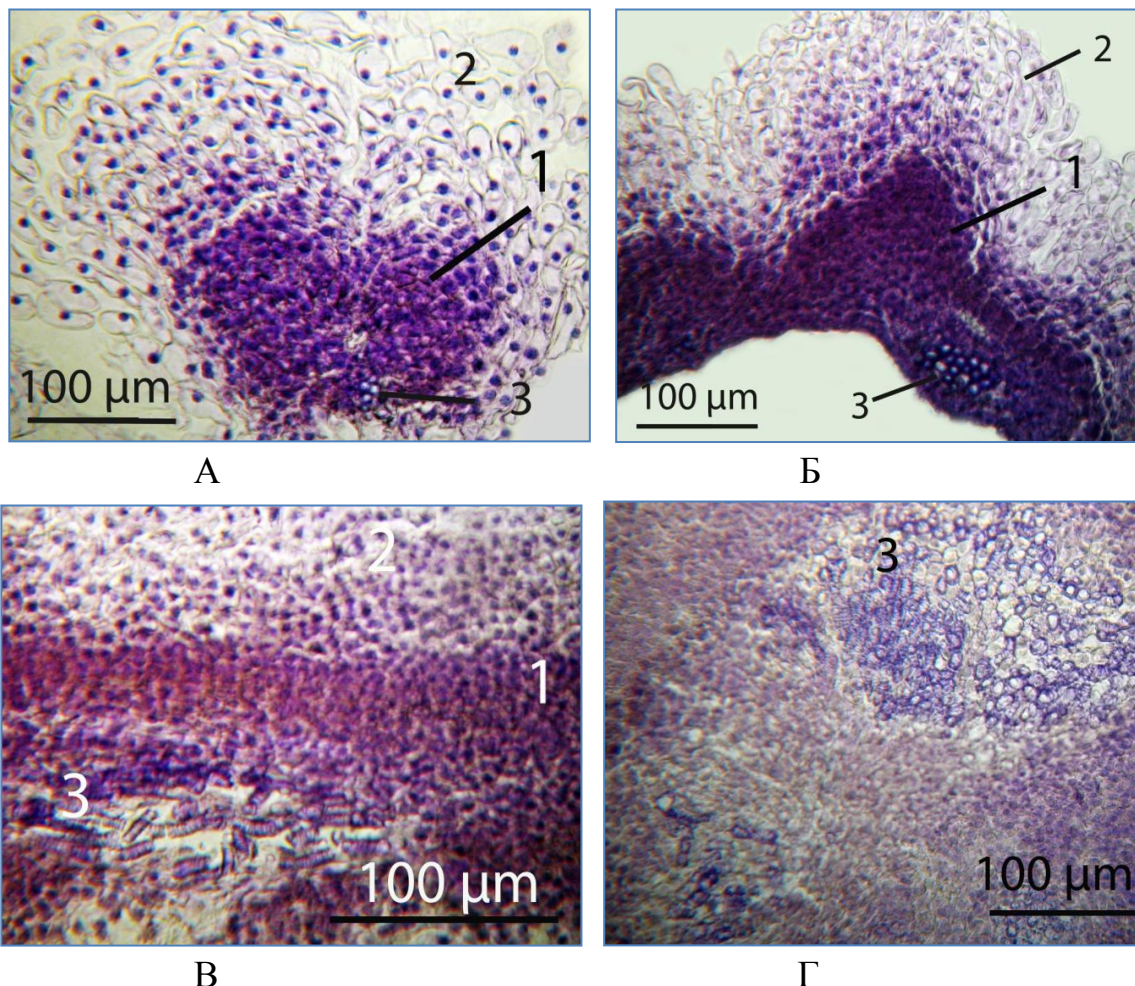
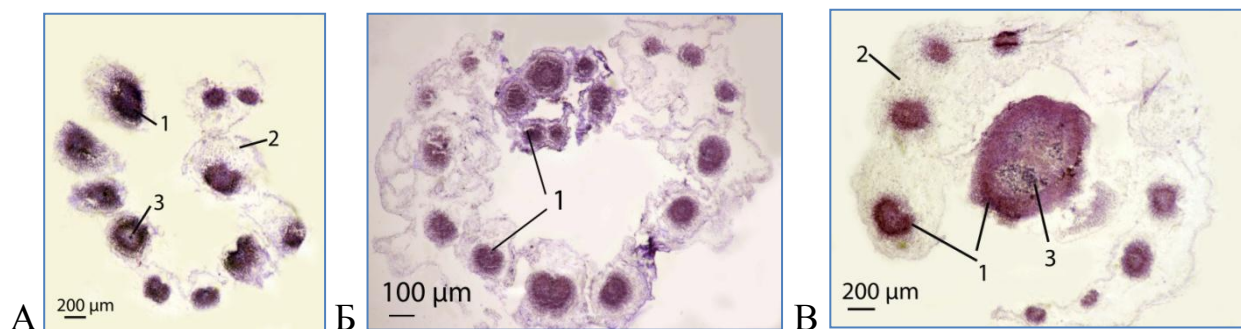


Рис. 3.24. Мікрофотографії 18-денного калюсу, культивованого на середовищі без антибіотика: А – поперечний переріз периферичного активного центру сорту Зимоярка, Б – поперечний переріз периферичного активного центру сорту Подольянка, В – поздовжній переріз периферичного активного центру сорту Подольянка, Г – поперечний переріз центрального активного центру сорту Зимоярка: 1–центр ростової активності, 2– паренхімна тканина, 3–ксилема.

При культивуванні калюсу з меристем сорту Зимоярка на середовищі без антибіотика на 13-14-день спостерігається розростання калюсу в першу чергу за рахунок утворення неупорядковано розміщених паренхімних клітин переважно по периферії листків, що приводить до розмежування проліфераційних центрів (рис. 3.24А, рис. 3.25А). Центри активного поділу складаються з дуже щільно розміщених дрібних клітин з великим ядром і малим вмістом цитоплазми. На 18 день в окремих центрах можна спостерігати елементи провідної системи з адаксіального боку обкладки, та в центральному активному центрі (рис. 3.24).

Після перенесення 18-добових калюсів на середовище МСР4, доповнене цефтриаксоном (400 мг/л) спостерігається подальший розвиток, а також збільшення кількості калюсної паренхімної тканини та елементів ксилеми.

Калюсна паренхімна тканина складається з дрібних клітин з неактивними ядрами. Під впливом цефтриаксону такі клітини розташовуються більш щільно біля центрів активного поділу і майже не з'єднані між собою в області епідерми. Починаючи з 6 дня культивування 18-добових калюсів сорту Зимоярка можна спостерігати утворення бруньки з апікальною зоною та примордіальними листками (рис. 3.25Е). У 20% калюсів брунька закладалася лише на 11 день культивування з центральної меристемної зони. На 11-13 день культивування подекуди утворюються корінці по одному з кожного активного центру периферичної обкладки (рис. 3.25И). Провідна система кожного нового корінця є продовженням провідних елементів калюсних меристемних центрів. З 12-14 дня в клітинах паренхіми калюсу можна спостерігати утворення хлорофілу. На 14 день культивування відбувається «розтріскування» периферичної обкладки калюсу, розмежовуючи окремі проліфераційні центри, що викликано ростовими процесами на фоні майже не з'єднаних між собою клітин калюсної паренхіми. Завдяки цьому можна спостерігати утворення нетипової зіркоподібної форми калюсу, культивованого на середовищі МСР4, доповненому 250-400 мг/л цефтриаксону (рис. 3.26). Протягом 20-30-го днів культивування відбувається подальший розвиток бруньки та формування рослини-регенеранта.



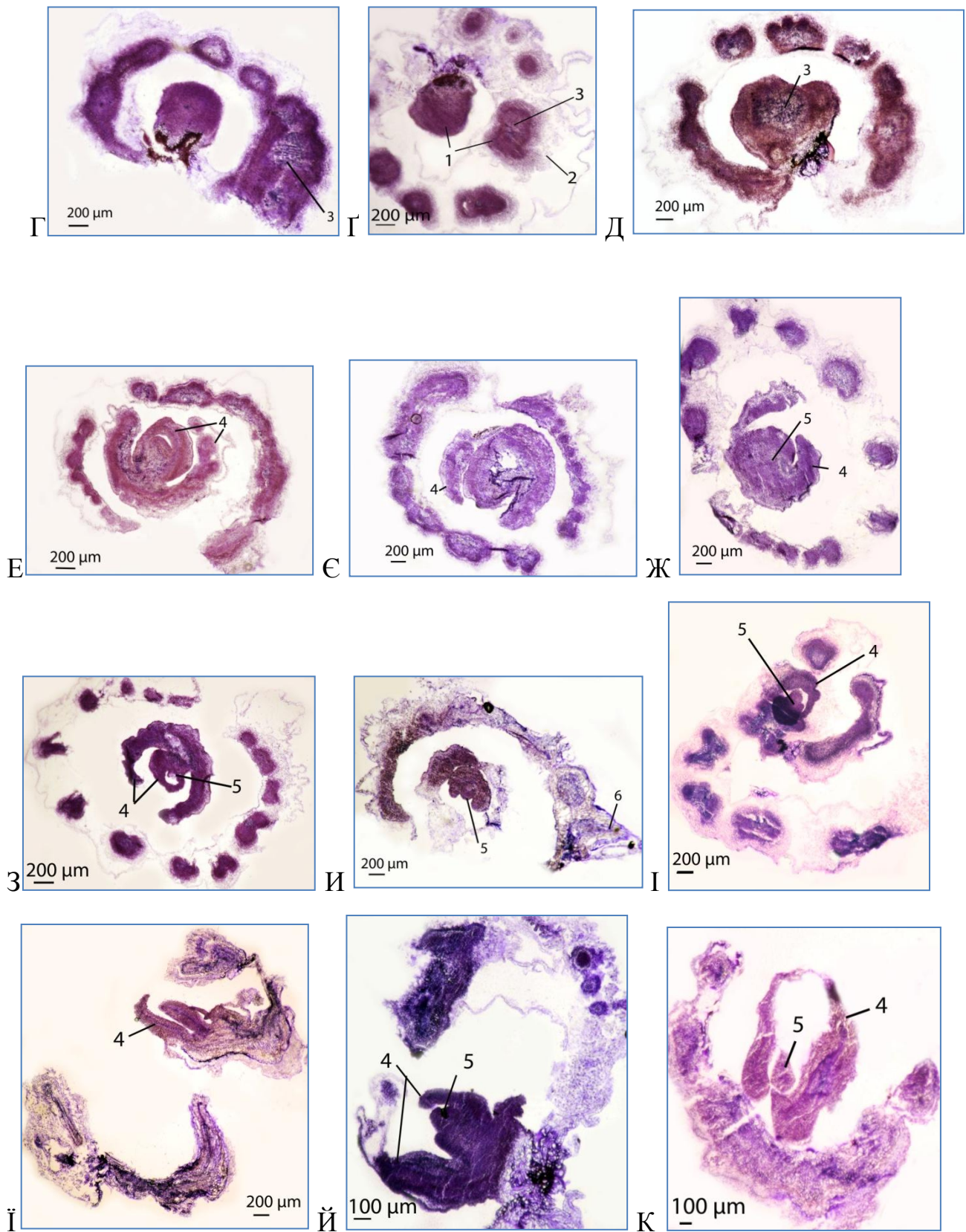


Рис. 3.25. Мікрофотографії калюсу сорту Зимоярка, культивованого на середовищі без антибіотика (поперечний переріз): А – 14 день, Б – 18 день (контроль); на середовищі з антибіотиком цефтриаксоном: В – 1 день, Г – 3 день, Д – 4 день, Е – 5 день, Ф – 6 день, З – 8 день, Ж – 9 день, И – 11 день; поздовжній

переріз:И – 13 день, І – 14 день, Ї – 15 день, Й – 17 день, К – 19 день: 1–центр  
ростової активності, 2–паренхімна тканина, 3–ксилема, 4–примордіальні листки,  
5–апикальна зона бруньки, 6–корінці.

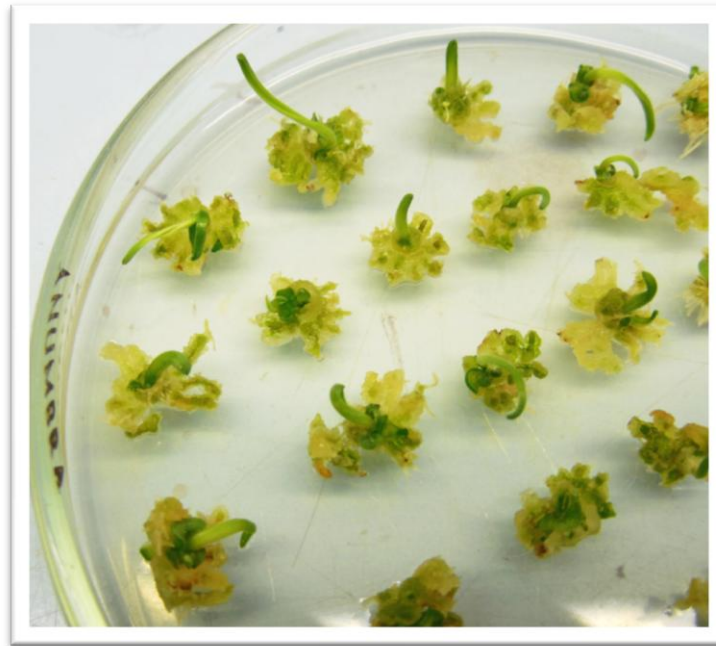
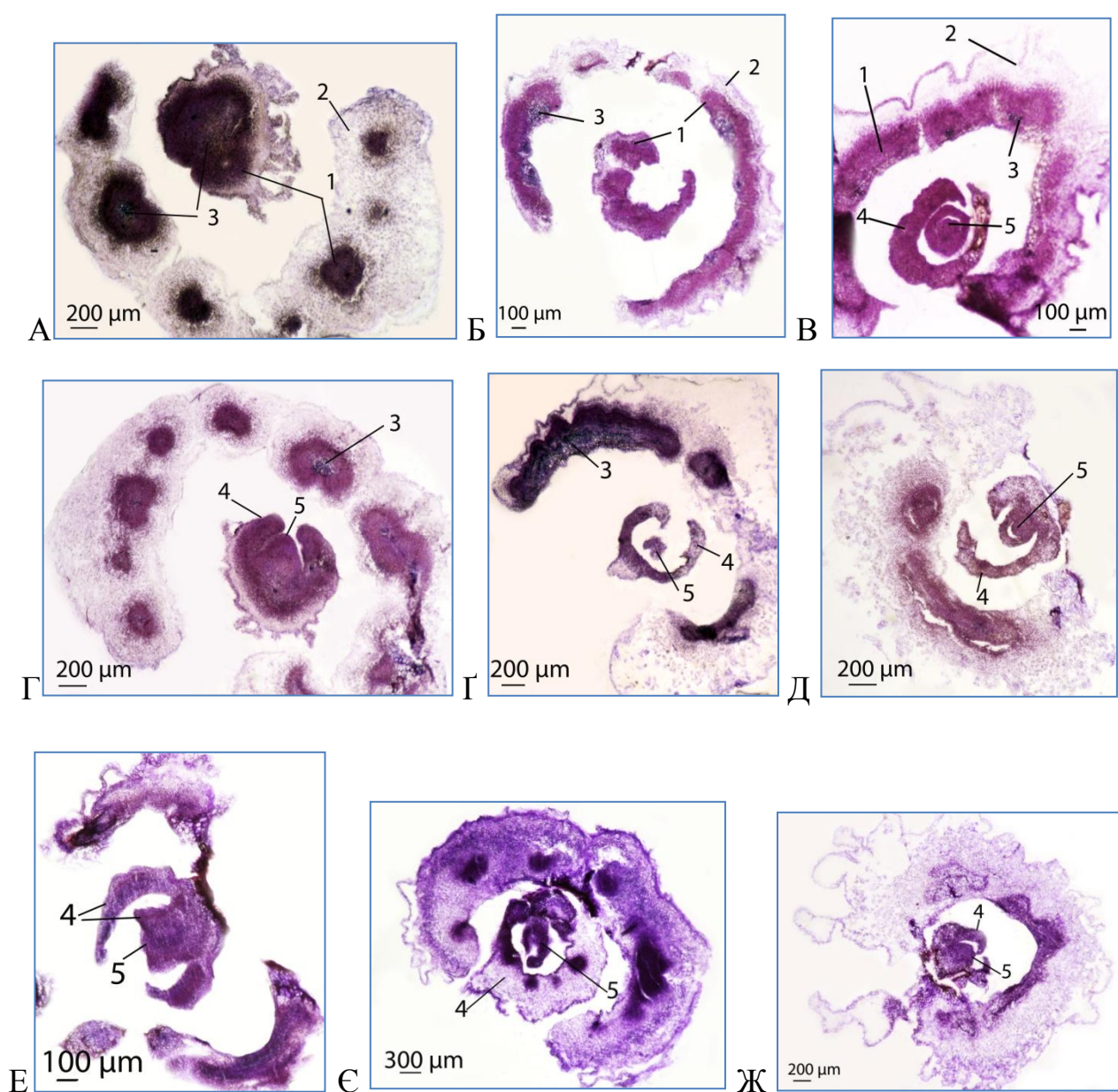


Рис. 3.26. Вплив цефтриаксону на морфологію калюсу пшениці м'якої *T. aestivum* сорту Зимоярка.

Перебіг морфогенезу сорту Подолянка при культивуванні калюсу на середовищі МСР4 з антибіотиком дуже схожий до такого у сорту Зимоярка. Проте спостерігається дещо швидше і синхронніше його протікання. Зокрема, вже на 2-3-тій день культивування калюсів сорту Подолянка на середовищі МСР4, доповненому цефтриаксоном, можна спостерігати утворення бруньки з апікальною зоною та примордіальними листками (рис. 3.27Г). А на 11 день 90% калюсів утворюють коріння, що формується по одному з кожного активного центру периферичної обкладки (рис. 3.27І). Клітини паренхімної тканини калюсу розташовуються значно щільніше і, відповідно, більш впорядковано, порівняно з сортом Зимоярка. Проліфераційна тканина переважно розміщена суцільним кільцем у вигляді «муфточка» (рис. 3.28), а не окремими центрами, тому значного розтріскування калюсу в процесі росту не відбувається. Утворення нетипової

зіркоподібної форми калюсу для сорту Подолянка на середовищі, доповненому цефтриаксоном, не спостерігається.

Цікаво, що в обох сортів корінці утворюються майже з кожного активного проліфераційного центру периферичної «обгортки» калюсу. Оскільки утворена брунька повністю пов'язана з провідною системою отриманих калюсів, це повністю відкидає теорію утворення соматичних ембріодів. При подальшому культивуванні на середовищі МСР4 з антибіотиком спостерігається розвиток коренів безпосередньо з бруньки. Таким чином, регенерація відбувається за типом прямого органогенезу: формується рослина-регенерант.



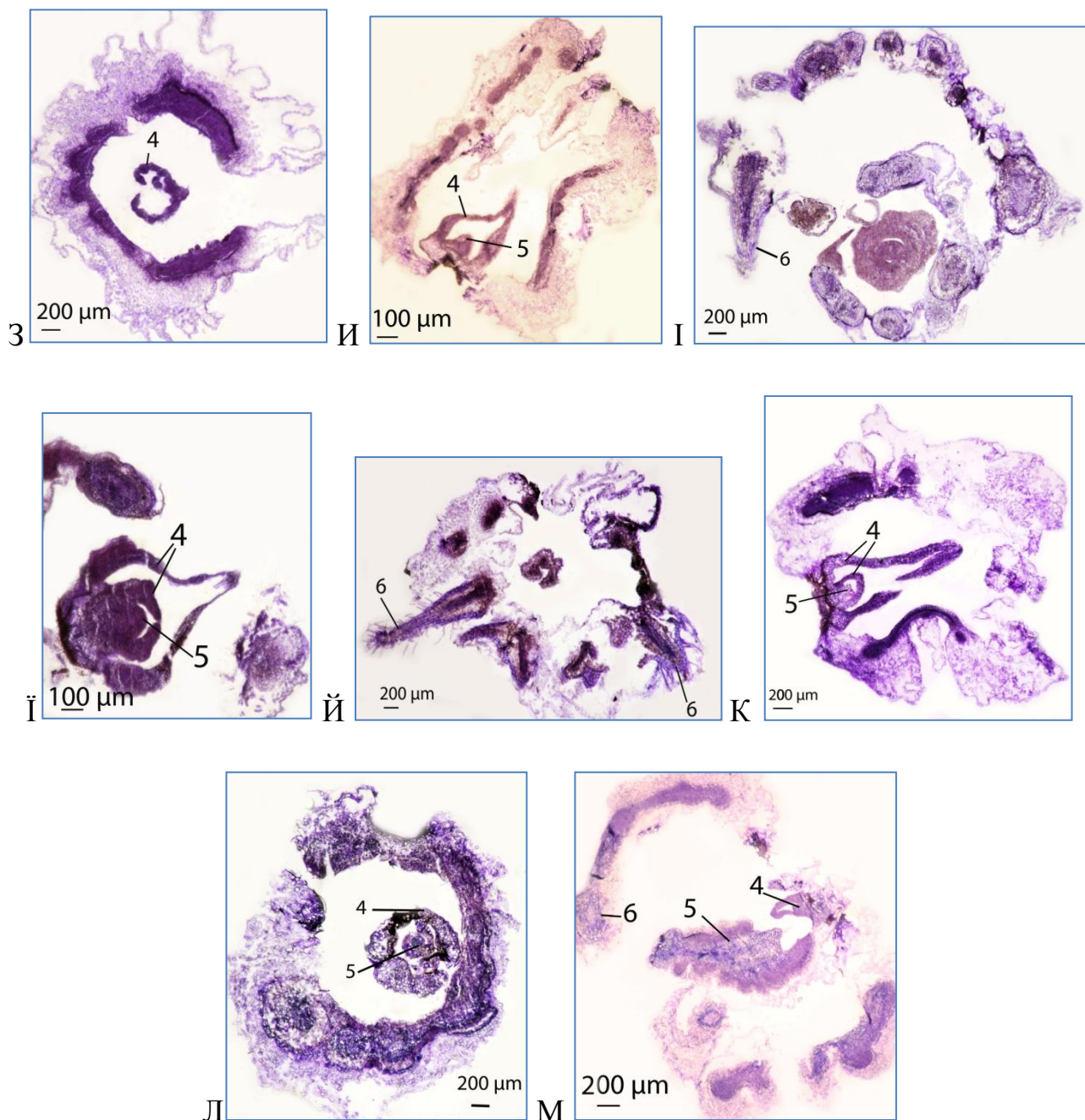


Рис. 3.27. Мікрофотографії калюсу сорту Подолянка, культивованого на середовищі без антибіотика (поперечний переріз): А – 14 день, Б – 18 день; на середовищі з антибіотиком цефтриаксоном: В – 1 день, Г – 3 день, Г – 4 день, поздовжній переріз: Д – 5 день, Е – 6 день, Є – 7 день, Ж – 8 день, З – 9 день (поперечний переріз), И – 10 день, I – 11 день, (поперечний переріз), Ї – 12 день, Й – 14 день, (поперечний переріз), К – 16 день, Л – 17 день, (поперечний переріз), М – 19 день: 1–центр ростової активності, 2–паренхімна тканина, 3–ксилема, 4–примордіальні листки, 5–апикальна зона бруньки, 6–корінці.

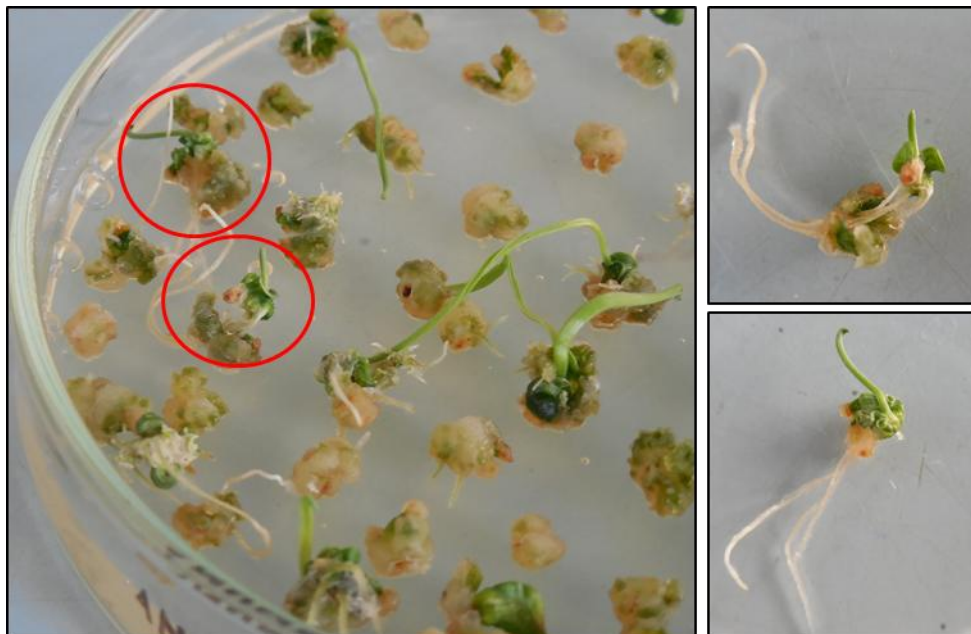


Рис. 3.28. Рослини-регенеранти сорту Подолянка, утворені на живильному середовищі для регенерації MSR4, доповненому антибіотиком цефтриаксоном.

В обох сортів регенеранти утворюються в центральній частині калюсної одиниці та легко відокремлюються від неї. За тривалого культивування на живильному регенераційному середовищі MSR4, доповненому цефтриаксоном, в місці прикріплення пагона до калюсної тканини формувалися корені (рис. 3.28). Це дає можливість отримати рослину-регенерант без етапу вкорінення на спеціальному середовищі. Такі рослини швидше формують кореневу систему порівняно з пагонами, отриманими на середовищі без цефтриаксону (контроль) (рис. 3.29). Візуально спостерігається інтенсивний приріст біомаси та розвиток надземної частини регенерантів.

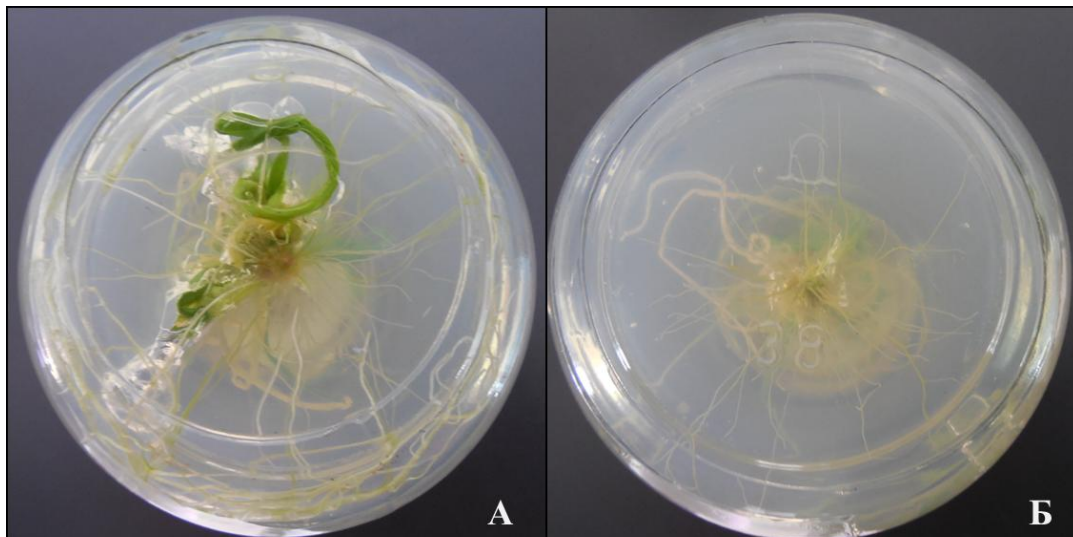


Рис. 3.29. Розвиток кореневої системи у рослин пшениці, отриманих на живильному регенераційному середовищі MSR4 за наявності цефтриаксону (А) та за його відсутності – контроль (Б).

Таким чином показано, що антибіотик цефтриаксон стимулює морфогенез та утворення коренів у досліджуваних сортів пшениці. В залежності від генотипу спричиняє утворення нетипової (зіркоподібної) форми калюсу. При культивуванні калюсів, отриманих з апікальних меристем, на середовищі MSR4, яке містить даний антибіотик, можна отримати регенерант із розвинутою кореневою системою. Такий факт дозволяє уникнути трудомісткої стадії вкорінення одержаних регенерантів.

### 3.5. Антибіотики тиментин та цефтриаксон як регулятори росту пшениці

Антибіотики (наприклад карбеніцилін, цефотаксим, тощо), які застосовуються для елімінації бактеріальних клітин під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* часто володіють ефектом, подібним до фітогормонів. Зазвичай низькі концентрації антибіотиків у середовищі для регенерації стимулюють утворення пагонів, однак вони не забезпечують ефективного інгібування *A. tumefaciens*. При застосуванні високих концентрацій антибіотиків часто відбувається пригнічення регенерації.

Дія антибіотиків, які розглядаються у дослідженні, залежить від компонентів, що входять до їх складу (рис. 3.30). Так, наприклад, тикарцилін – один із компонентів тиментину – має хімічну структуру, подібну до карбеніциліну і пеніциліну G, які володіють ауксиноподібними властивостями [244, 270].

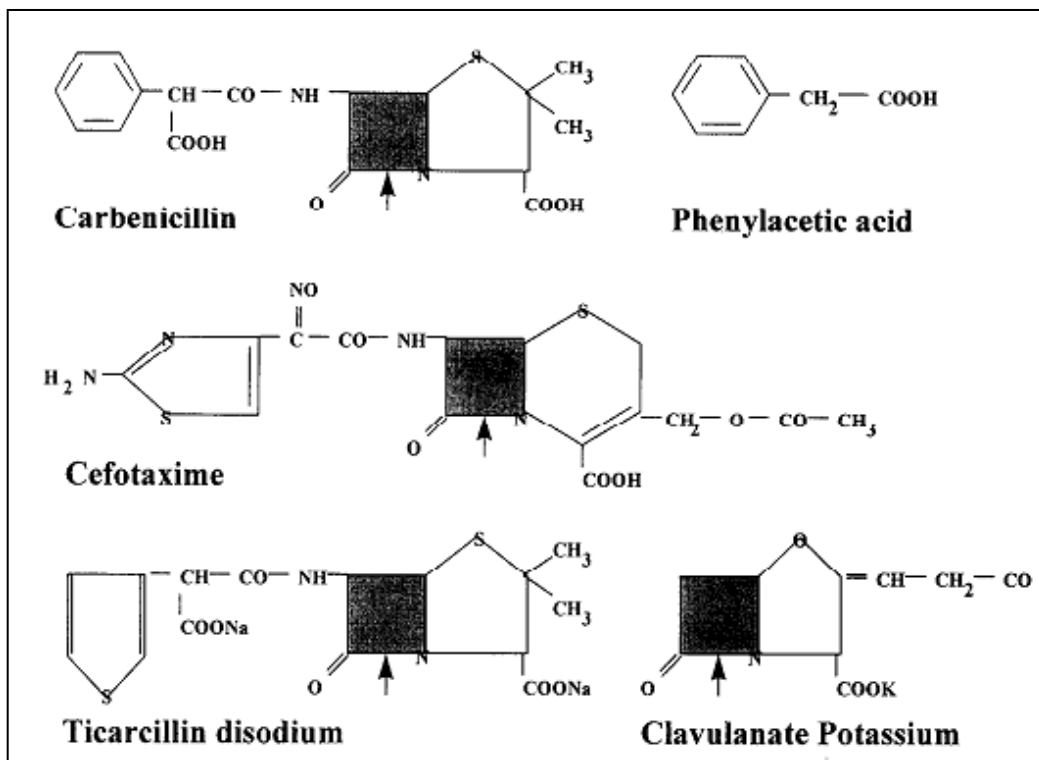


Рис. 3.30. Структура карбеніциліну, фенілоцтової кислоти, цефотаксиму, тикарциліну та клавуланової кислоти. Стрілками показано сайт гідролізу β-лактамази [244].

Цефтриаксон також відноситься до групи β-лактамів, у своїй будові схожий з пеніциліном G і здатний індукувати утворення фенілоцтової кислоти, яка є слабким природним ауксином [244, 271]. Рослинний організм володіє різним рівнем ендогенних регуляторів росту, який впливає на здатність культури тканин регенерувати пагони у присутності антибіотиків. Взаємодія ендогенних фітогормонів із продуктами розпаду β-лактамних антибіотиків може підсилювати або інгібувати регенерацію пагонів [67, 271].

За отриманими даними нами встановлено, що внесення у культуральне середовище для регенерації МСР4 антибіотиків тиментину та цефтриаксону підвищує регенерацію з калюсу пшениці апікального походження. Тому наступним завданням у роботі було встановити вплив даних антибіотиків на частоту утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів пшениці сортів Подолянка та Зимоярка без залучення додаткових регуляторів росту.

18-добовий калюс поміщали на безгормональне модифіковане середовище для регенерації МСТ (табл. 2.1). В таке середовище вносили тиментин або цефтриаксон у концентраціях від 25 мг/л до 500 мг/л. Культивування поводити за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду протягом місяця. В якості контролю використовували культуральне середовище МСТ без антибіотику.

За наявності у живильному середовищі МСТ тиментину у різних концентраціях спостерігається інтенсивне утворення коренів з калюсу в обох генотипів пшениці. Не дивлячись на те, що частота утворення морфогенного калюсу становила близько 70%, а регенерація пагонів розпочиналася доволі рано – на 7 день культивування експлантів на живильному середовищі, частота утворення пагонів в середньому складала  $5,3 \pm 2,5\%$ , тобто була дуже низькою.

Таким чином, антибіотик тиментин володіє властивостями, подібними до ауксинів і може лише підсилювати дію інших фітогормонів під час регенерації пагонів. Тому його застосування як самостійного регулятора росту недоцільне.

Ефективність застосування цефтриаксону для утворення пагонів на безгормональному середовищі була вищою, порівняно з тиментином.

Утворення морфогенних осередків розпочиналося на 8-10-й день культивування. Появу перших пагонів спостерігали на 15-й день. Протягом усього дослідження некрозу калюсу навіть при високих концентраціях (300-500 мг/л) цефтриаксону не відбувалося (рис. 3.31).

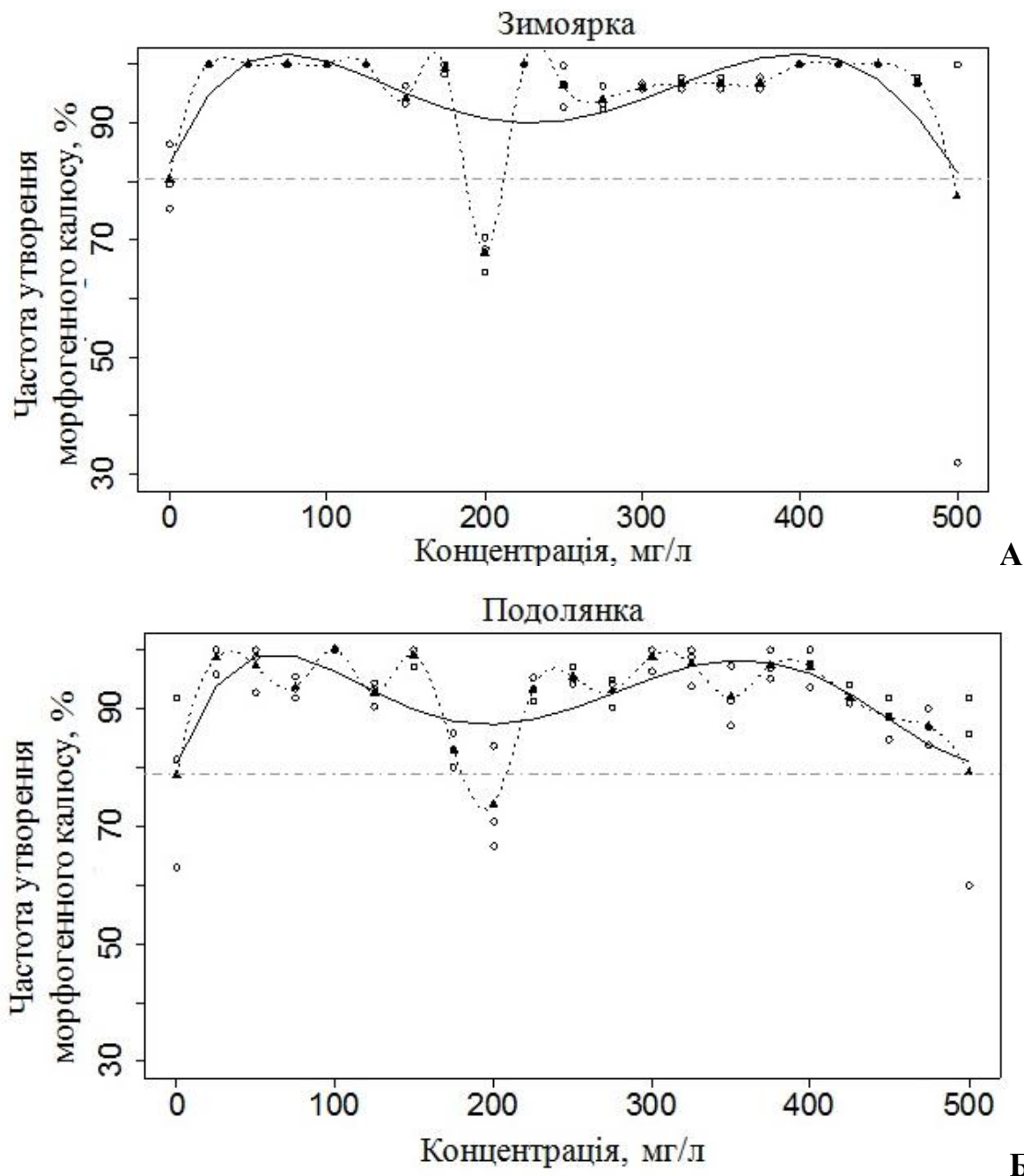
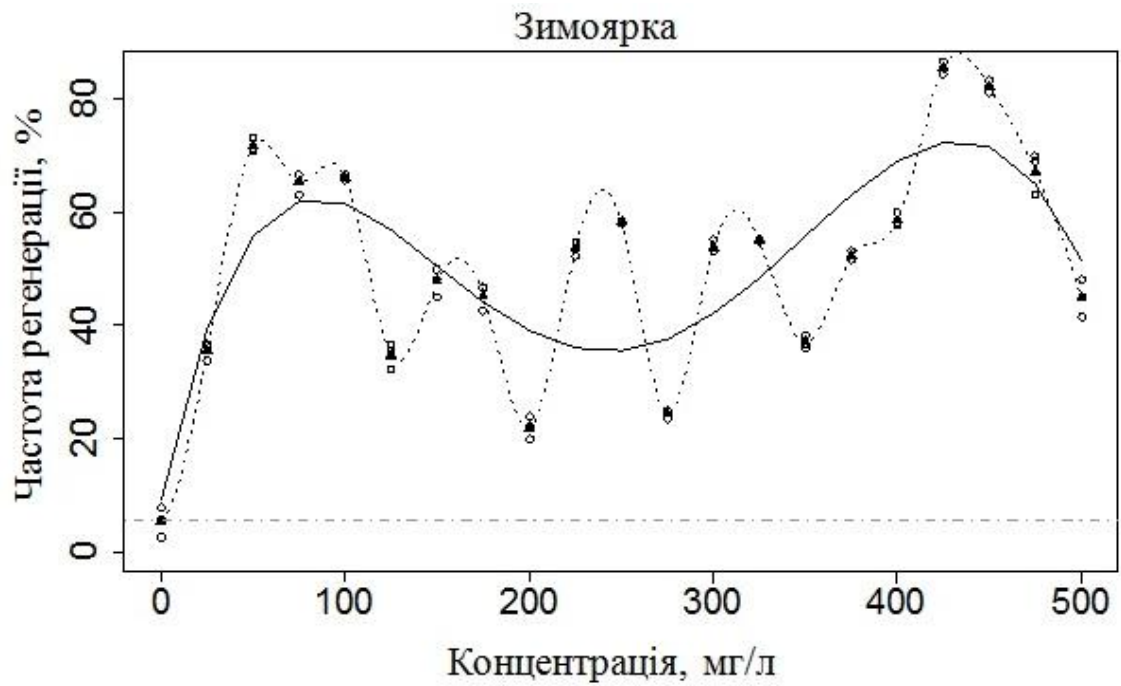


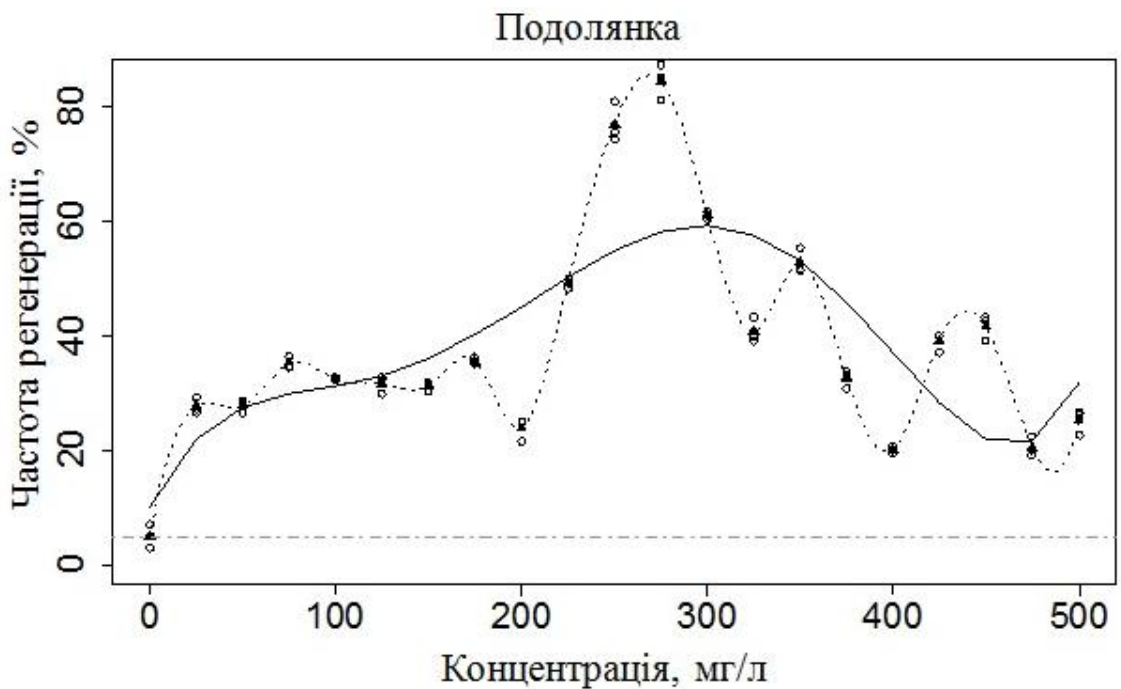
Рис. 3.31. Частота утворення меристематичних осередків у калюсі сортів Зимоярка (А) та Подольанка (Б) на безгормональних середовищах, доповнених різними концентраціями антибіотику цефтриаксону.

Примітка:  $p < 0,05$ .

Для сорту Зимоярка високі показники регенерації (до 70%) спостерігалися за концентрацій 50-100 мг/л антибіотику, однак найвищий відсоток утворення пагонів (до 85%) забезпечували 425-450 мг/л цефтриаксону (рис. 3.32А, 3.33, табл. 3.11).



**А**



**Б**

Рис. 3.32. Частота регенерації пагонів з калюсу сортів Зимоярка (А) та Подільянка (Б) на безгормональному середовищі МСТР, доповненому різними концентраціями антибіотику цефтриксону. Примітка:  $p < 0,05$ .

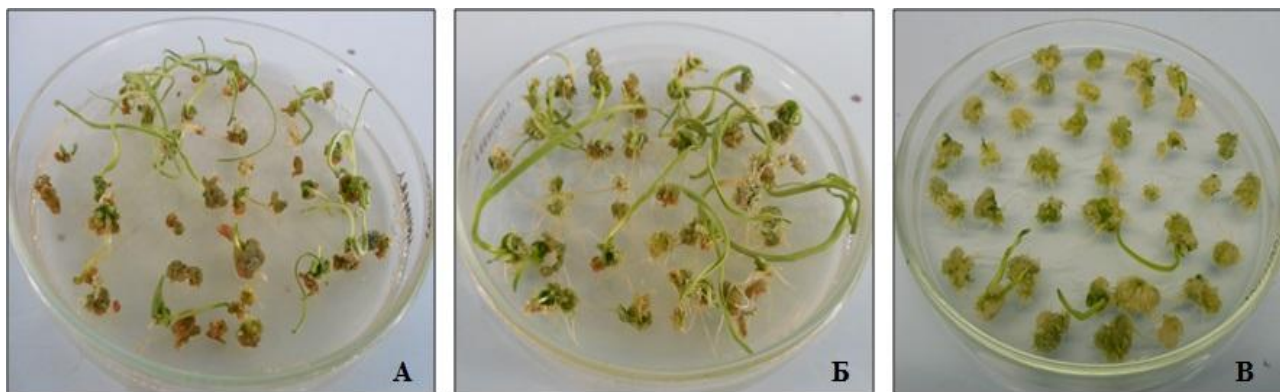


Рис. 3.33. Регенеранти пшениці сорту Зимоярка, отримані на безгормональному живильному середовищі МСТР, доповненому 100 мг/л (А), 425 мг/л цефтриаксону (Б). Контроль (В) – середовище без антибіотика.

Таблиця 3.11

Рівень статистичної значимості у тесті Ст'юдента для двох генотипів пшениці (Зимоярка та Подолянка)

Концентрація цефтриаксону мг/л	Рівень статистичної значимості		
	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація
25	0,42265	0,370719	0,002960*
50	0,24474	0,255299	0,000003**
75	0,00786*	0,073085	0,000183*
100	0	0,254347	0,000001**
125	0,00693*	0,189640	0,128547
150	0,07398	0,439193	0,002672*
175	0,00451*	0,694528	0,014972*
200	0,37698	0,108144	0,330615
225	0,00775*	0,134676	0,011243*
250	0,57117	0,954095	0,014420*
275	0,65208	0,714327	0,000846**
300	0,16281	0,095180	0,001919*
325	0,51070	0,248679	0,007882*
350	0,24352	0,968965	0,001642*
375	0,56684	0,485114	0,000277**
400	0,20671	0,575090	0,000024**
425	0,00432*	0,051043	0,000003**
450	0,00844*	0,136212	0,000058**
475	0,00913*	0,065546	0,000307**
500	0,73078	0,017086*	0,001481*
<b>Контроль</b>	0,95219	0,284115	0,850117

Примітка: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,001$

Для сорту Подолянка були отримані інші результати: частота регенерації була найвищою ( $\approx 80-85\%$ ) за наявності у культуральному середовищі 250-275 мг/л цефтриаксону (рис. 3.32Б, табл. 3.8). Низькі і високі концентрації сприяли утворенню меншої кількості регенерантів. Не зважаючи на це, всі використані у дослідженні концентрації даного антибіотика не чинили негативного впливу на процеси морфогенезу та регенерації. За присутності будь-якої кількості цефтриаксону у культуральному середовищі спостерігали інтенсивне та прискорене утворення пагонів, порівняно з контролем (рис. 3.32Б, 3.34). Крім цього ефективність регенерації становила 2-3 пагони на 1 експлант у досліді, тоді, як в контролі утворювався лише 1 пагін на кожний експлант.



Рис. 3.34. Регенеранти пшениці сорту Подолянка, отримані на безгормональному живильному середовищі МСТР, доповненому 250 мг/л (А) та 275 мг/л цефтриаксону (Б). Контроль (В) – середовище без антибіотика.

За отриманими даними можна стверджувати, що цефтриаксон доцільно використовувати під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. Даний антибіотик не лише ефективно елімінує агробактерії, а й здатний у високих концентраціях стимулювати регенерацію пагонів без участі інших фітогормонів. Крім цього він сприяє утворенню коренів у регенерантів. Таким чином, застосування цефтриаксону може спрощувати процедуру генетичної трансформації: дозволяє уникнути стадії вкорінення.

Вплив будь-якого антибіотика, зокрема і цефтриаксону, залежить від генотипу пшениці. Встановлено, що для сорту Зимоярка концентрації 425-

450 мг/л є найефективнішими для утворення регенерантів, в той час, як для сорту Подолянка – 250-275 мг/л (рис. 3.35).

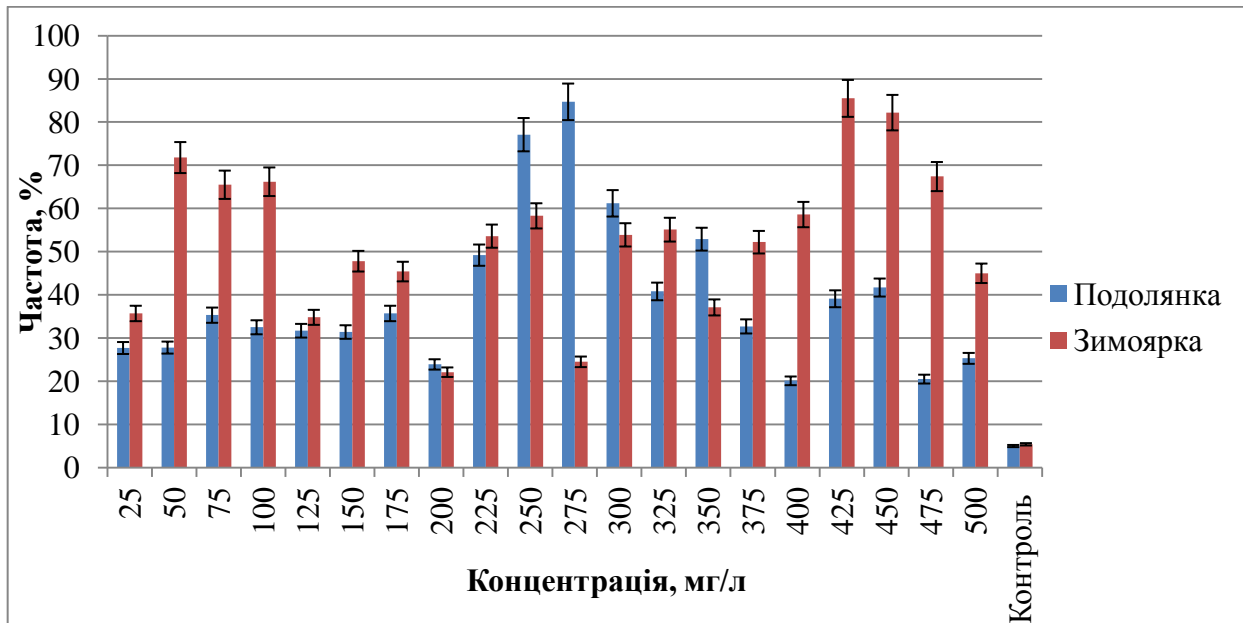


Рис. 3.35. Частота регенерації пагонів пшениці сортів Зимоярка та Подолянка на безгормональних середовищах, доповнених різними концентраціями антибіотику цефтриаксону.

Нами показано, що ефективність використання середовища, доповненого антибіотиком цефтриаксоном, яке не містить фітогормонів значно більша порівняно з ефективністю застосування середовища МСР4 (рис. 3.35, 3.36). Для обох сортів на такому культуральному середовищі спостерігається високий відсоток пагоноутворення (до 85%). На середовищі, доповненому регуляторами росту (БАП та піклорам) у поєднанні з цефтриаксоном частота регенерації була значно нижчою (40-60%).

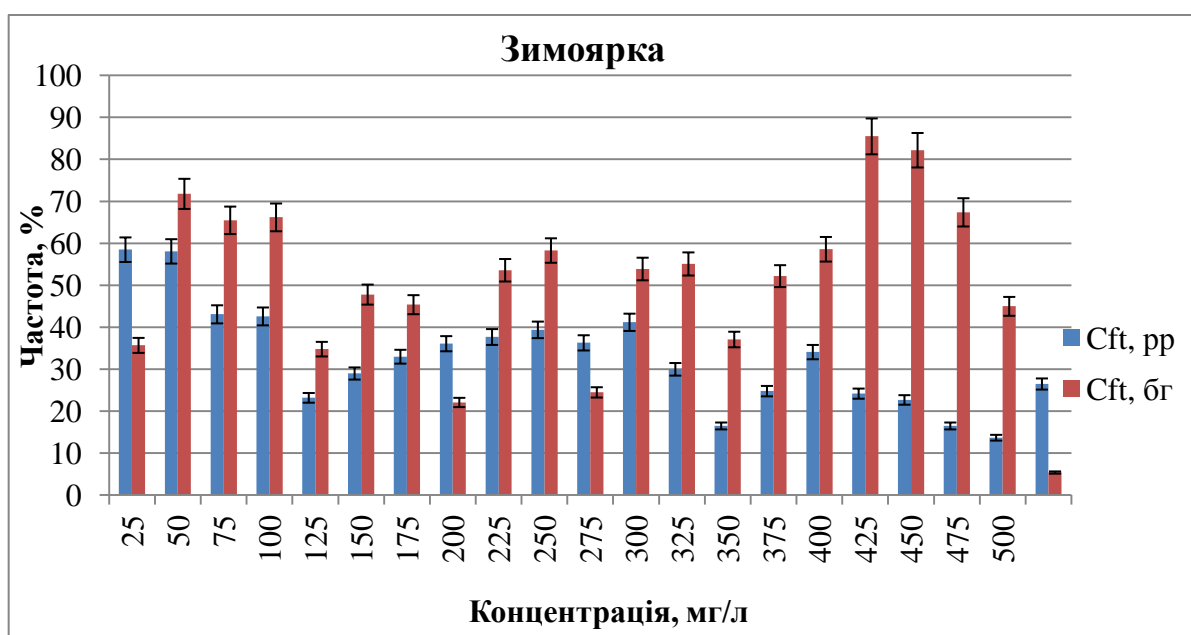
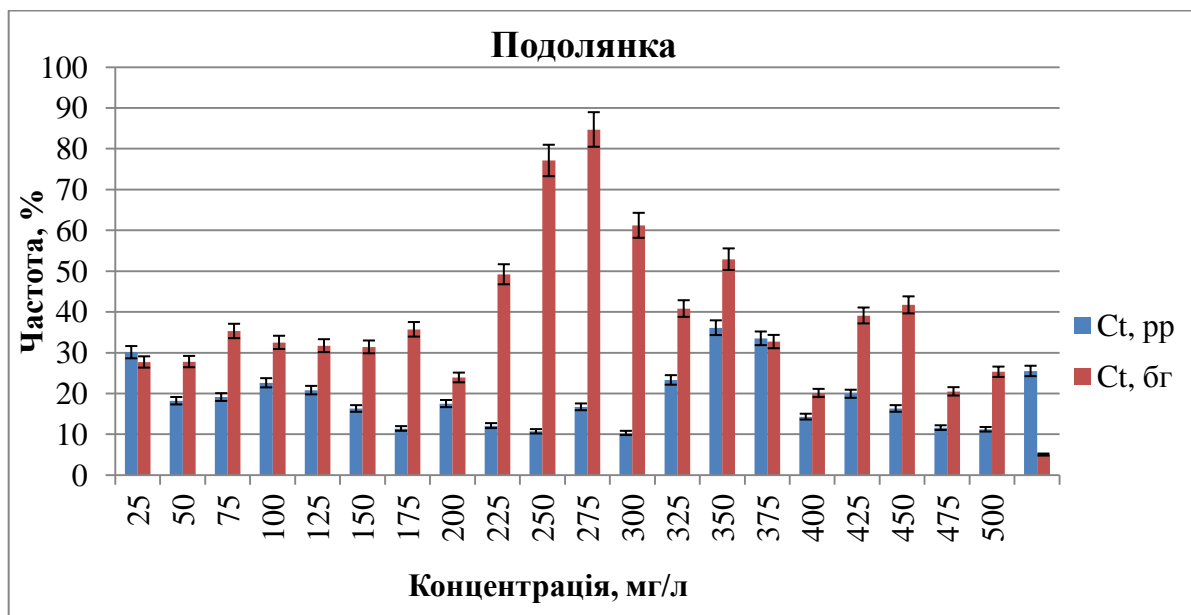


Рис. 3.36. Залежність частоти регенерації пагонів пшениці сортів Подольянка та Зимоярка від вмісту у культуральному середовищі регуляторів росту та антибіотика цефтриаксону.

*Примітка:* Cт, pp – середовище для регенерації, доповнене регуляторами росту (MCP4) в поєднанні з цефтриаксоном; Cт, бг – безгормональне середовище MCTP, доповнене різними концентраціями цефтриаксону.

Методом багатofакторного дисперсійного аналізу показано вплив чотирьох факторів (концентрації антибіотику, його типу, присутності регуляторів росту в середовищі та генотипу) на морфогенетичні процеси у пшениці (рівень значущості  $p < 0,001$ ). Встановлено, що здатність до утворення морфогенних зон

залежить тільки від генотипу, частота регенерації – від типу антибіотика, його концентрації та генотипу. На частоту утворення коренів впливає тільки наявність/відсутність антибіотика у живильному середовищі.

На основі проведеної роботи можна зробити такі узагальнення:

- за використання 18-добового калюсу, отриманого з апікальних меристем 3-добових проростків пшениці *Triticum aestivum in vitro* спостерігається найвища частота регенерації калюсу. Калюс на 14-добу ще недостатньо дедиференційований, а частота регенерації з 21-добового нижча порівняно з частотою пагоноутворення з 18-добового;
- На середовищі для регенерації MCP4 (0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам) частота регенерації пагонів складає близько 36%, тому таке живильне середовище доцільно використовувати під час роботи з калюсною культурою. Отримані на середовищі MCP4 регенеранти добре адаптуються до ґрунтових умов та проявляють високу життєздатність під час культивування в умовах теплиці;
- для елімінації *A. tumefaciens* штамів АВІ та GV3101 доцільно використовувати антибіотики тиментин та цефтриаксон, оскільки вони більш ефективно пригнічують ріст агробактерій порівняно з цефотаксимом;
- вивчено вплив антибіотиків β-лактамної групи тиментину та цефтриаксону на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої. Встановлено, що на регенерацію пагонів у пшениці впливає тип антибіотика, його концентрація у культуральному середовищі та генотип; на утворення морфогенного калюсу – лише генотип. Утворення коренів відбувається за будь-якої кількості антибіотика. Таким чином, ризогенез залежить від генотипу та наявності/відсутності антибіотика у живильному середовищі;
- виявлено, що приріст біомаси рослин, отриманих на живильному середовищі, доповненому антибіотиком цефтриаксоном залежить лише

від наявності або відсутності у культуральному середовищі антибіотика.

Впливу генотипу на даний показник не спостерігається;

- показано, що антибіотики  $\beta$ -лактамної групи тиментин та цефтриаксон володіють властивостями рослинних регуляторів росту. Тиментин може бути використаний лише в якості додаткового підсилувача морфогенетичних процесів у пшениці, оскільки характеризується ауксиноподібною активністю. Цефтриаксон може як підсилювати дію інших фітогормонів, так і бути використаний як самостійний регулятор. Вплив цефтриаксону залежить від генотипу пшениці: у випадку сорту Зимоярка найефективнішими для утворення регенерантів є концентрації 425-450 мг/л, в той час, як для сорту Подолянка – 250-275 мг/л. Використання живильного середовища МСТ, доповненого антибіотиком цефтриаксоном (середовище МСТР) значно ефективніше для регенерації пагонів пшениці порівняно із застосуванням середовища МСР4. Для обох генотипів на живильному середовищі МСТР спостерігається високий відсоток пагоноутворення (до 85%), у той час, як на середовищі доповненому регуляторами росту (БАП та піклорам) – 40-60%;
- застосування цефтриаксону під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *in vitro* дає можливість отримати регенеранти без використання фітогормонів (наприклад, БАП, піклорам, тощо) та уникнути етапу укорінення на спеціальному середовищі, чим може зменшити собівартість процесу отримання біотехнологічних рослин пшениці.

## РОЗДІЛ 4

### **AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ В УМОВАХ *IN VITRO***

#### **4.1. Перенесення чужорідних цільових генів *in vitro* у рослинний організм за допомогою *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація стала найпоширенішим методом для введення чужорідних генів у рослинні клітини з подальшою регенерацією трансформантів. Ефективність його застосування в значній мірі залежить від всіх факторів, які безпосередньо впливають на процес перенесення трансгенів, розробки ефективного протоколу, а також від чіткого планування роботи та виконання всіх етапів. Процес генетичної трансформації за допомогою агробактерій включає наступні кроки:

- 1) вилучення/клонування генів інтересу з вихідного організму;
- 2) створення ефективної векторної конструкції, яка б включала ген інтересу, промотори та інтрони, маркерні гени для покращення ідентифікації трансформантів, а також енхансери для підвищення експресії генів інтересу;
- 3) перенесення T-ДНК-вмісної плазмиди в *Agrobacterium*;
- 4) власне перенесення T-ДНК від *Agrobacterium* у рослинні клітини;
- 5) інтродукція T-ДНК у рослинний організм;
- 6) регенерація біотехнологічних рослин *in vitro*;
- 7) аналіз експресії перенесеного гена в отриманих рослинах на рівні лабораторії, теплиці та в природному середовищі [138].

Важливою для підвищення ефективності трансформації є оптимізація умов культивування експлантів з метою мінімізації загибелі рослинних клітин після агробактеріальної трансформації та розробка селективної системи, яка б давала можливість відібрати трансформанти. Протягом багатьох десятиліть пшениця вважалася доволі непридатним для трансформації об'єктом (у

порівнянні з рисом і кукурудзою) в основному за рахунок низької ефективності регенерації в умовах *in vitro*. Було проведено та проводиться багато досліджень з оптимізації меодик, за використання яких підвищується ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації більшості злакових культур [170, 272-273].

Таким чином, постає необхідність оптимізації параметрів процесу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, зокрема злаків. Їх перелік для пшениці не сильно відрізняється від такого для рису та кукурудзи, однак деякі параметри, все ж таки, залишаються відмінними. Слід також зазначити, що для кожного об'єкту всі параметри підбираються індивідуально. Цим пояснюється низька відтворюваність протоколів у інших лабораторіях та частота трансформації пшениці [274]. Тому, основні зусилля під час генетичної трансформції рослин спрямовані на встановлення та дослідження всіх чинників, які впливають на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію та розробку нових протоколів, які б забезпечували високу ефективність отримання біотехнологічних рослин пшениці, а також легко відтворювалися у різних лабораторіях.

Для генетичної трансформації був використаний 18-добовий калюс пшениці сортів Зимоярка та Подолянка.

Спершу бактеріальну суспензією *A. tumefaciens* штаму АВІ (p014) готували за наступною методикою: окремо відібрані колонії *A. tumefaciens* висівали у рідке живильне середовище Himedia M002 з додаванням антибіотиків канаміцину та спектиномицину у концентрації 100 мг/л. Крім цього у середовище вносили 100 мг/л ацетосирінгону та 0,04 % Silwet L77 [8]. Отриману суспензію культивували протягом ночі на ротаційному шейкері. Наступного ранку вимірювали її оптичну щільність, яку доводили до  $OD_{600}=0,2$ . Експланти витримували в бактеріальній суспензії протягом 5-10 хв. Після цього просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МСК (табл. 2.1), культивували в умовах темряви за температури 27° С протягом 48 год. Пізніше калюс переносили на середовище для

регенерації МСР4, доповнене 100 мг/л Km та 400 мг/л Cf та культивували за температури 24 °С до утворення регенерантів.

Одним із факторів, які впливають на ефективність трансформації є щільність бактеріальної суспензії ( $OD_{600}$ ). Оптимальна кількість бактеріальних клітин в 1 мл суспензії для різних штамів, культур та генотипів знаходиться в діапазоні від 0,2 до 2 [16, 146, 275]. В наших експериментах використання бактеріальної суспензії з  $OD_{600}=0,2$  під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації не дало змоги отримати трансформанти, таким чином описана вище методика приготування бактеріальної суспензії виявилася неефективною.

В подальшому крім штаму АВІ використовували штам GV3101 та методику Сидорова [228] з певними модифікаціями: окремі колонії агробактерій переносили з агаризованого середовища LB у 25 мл рідкого живильного середовища LB, доповненого 100 мг/л Km та Spc (АВІ); 100 мг/л Сb, 25 мг/л Gm, 50 мг/л Rf (GV3101). Отриману суспензію культивували протягом ночі на ротаційному шейкері при 200 об/хв. і температурі 26 °С. Наступного ранку бактеріальну суспензію розводили 1:5 свіжим середовищем LB та центрифугували при 4000 об/хв. протягом 15 хв. Зливши супернатант, клітини ресуспендували в 10 мл індукційного середовища, яке містило ацетосирінгон та відповідні антибіотики (залежно від штаму, який використовували). Оптичну щільність доводили до  $OD_{600}=0,2$ . Отриману суспензію *A. tumefaciens* повторно культивували протягом ночі на ротаційному шейкері при 200 об/хв. і температурі 26 °С. Нічну культуру агробактерій осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв і ресуспендували в 6-10 мл інокуляційного середовища, доповненого ацетосирінгоном. Оптичну щільність бактеріальної суспензії доводили до  $OD_{600}=0,4$ .

Ну із співавторами показано, що найвища частота трансформації пшениці (4,4 %) за використання штаму *A. tumefaciens* СР4 спостерігалася при  $OD_{600}=0,5$  [94]. За даними Rashid при даній оптичній щільності бактеріальної суспензії штаму ЕНА101 ефективність отримання біотехнологічних рослин становила 12,5%. У випадку  $OD_{600}=0,75$  та 1,0 трансформація складала 4,07% та 0,0%

відповідно [146]. При збільшенні значення оптичної щільності спостерігається надмірний ріст *A. tumefaciens* в результаті чого відбувається загибель експлантів. Найвищу частоту трансформації отримали Sarker та Biswas за використання штаму ЕНА105 та  $OD_{600} = 0,75$  [276], а також Wang із співавторами при використанні бактеріальної суспензії з  $OD_{600} = 1,0$  [277].

У роботі використовували оптичні щільності бактеріальної суспензії, які становили 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1. При використанні суспензії агробактерій з оптичною щільністю  $OD_{600} = 0,2$  утворювалась велика кількість морфогенних зон, однак з такого калюсу трансформантів не отримано. За використання  $OD_{600} = 0,6$  спостерігалася бактеріальна контамінація зразків калюсу до 50%. При збільшенні концентрації агробактерій до  $OD_{600} = 0,8$ , та 1 у частини калюсів (близько 75-80%) спостерігали некроз та загибель протягом тижня культивування на живильному середовищі для регенерації. Інша частина експлантів характеризувалася сильною бактеріальною контамінацією та невдовзі гинула.

Нами показано, що найефективнішою оптичною щільністю *A. tumefaciens* для забезпечення нормального протікання морфогенетичних процесів у калюсів, отриманих із апікальних меристем пшениці сортів Зимоярка та Подолянка, є  $OD_{600} = 0,4$ . При даному значення  $OD_{600}$  спостерігається максимальне утворення морфогенних осередків (до 50,7%) та відсутність вираженої бактеріальної контамінації.

В процесі *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації більшості культур для індукції *vir* активності рекомендовано використовувати хімічні речовини, такі як ацетосирінгон. Показано, що за його відсутності спостерігається досить низький рівень експресії *gus*-гену, а також відсутність регенерації стабільних трансформантів у рису та ячменю [12, 144, 278]. Однак, деякі експланти в однодольних можуть бути успішно трансформовані без допомоги зовнішніх хімічних індукторів. Наприклад, меристеми цукрової тростини за попередньої обробки антинекротичною сумішшю (аскорбінова кислота, цистеїн та нітрат срібла) [279], незрілі зародки та ембріогенний калюс

пшениці [151] можуть бути ефективно трансформовані в умовах підсушування. В наших дослідах з метою підсилення ефективності трансформації пшениці за допомогою агробактерій використовували ацетосирінгон у концентрації 200  $\mu\text{M}$  як зазначено в роботі Patnaik [170].

Селекційна система – один із найбільш важливих факторів, що впливають на ефективність трансформації. Застосування селективних агентів може не лише негативно впливати на нетрансформовані клітин, а й пригнічувати регенерацію трансформованих.

Як правило, для селекції рослин, трансформованих геном *nptII* ефективно використовується антибіотик канаміцин. Однак, для деяких видів спостерігається негативний вплив даного антибіотика на регенерацію. Це значно знижує частоту трансформації. Одним із шляхів вирішення даної проблеми є зміна умов селекції або заміна селективного гена *nptII* на інший селективний ген [245, 280-282].

В наших дослідах для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* використовували генетичні вектори p014 (ген інтересу *nptII*, та маркерний – *sgfp*) та pCB203 (ген інтересу *bar*, маркерний – *gus*).

В якості селективного агента для ефективного відбору трансформантів за використання генетичної конструкції p014 використовували антибіотики канаміцин та паромоміцин у концентрації 100 мг/л, а для pCB203 – фосфіотрицин (5 мг/л). Сформовані 18-добові калюси сорту Зимоярка (2790 шт.) та Подолянка (1155 шт.) витримували у бактеріальній суспензії протягом 15 хв., просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище для спільного культивування, яке тривало 48 год. у термостаті за температури 27 °C. Після ко-культивування з *A. tumefaciens* штаму АВІ калюс переносили на живильне регенераційне середовище МСР4 (табл. 3.1), доповнене 100 мг/л канаміцину, 400 мг/л цефтриаксону та культивували за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду протягом 60-ти днів. Формування первинних меристематичних осередків починалося на 15-й день, однак частина калюсів залишалася неморфогенною з чітко вираженими

процесами некрозу. Частота утворення морфогенного калюсу в середньому складала  $44,9 \pm 2,9$  % – у сорту Зимоярка та  $40,3 \pm 1,3$  % – у сорту Подолянка, а частота регенерації становила  $18,8 \pm 0,8$ % та  $16,5 \pm 1,4$ % відповідно (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Вплив селективних агентів на частоту трансформації пшениці *A.*

*tumefaciens* штаму АВІ

Сорт	Зимоярка		Подолянка	
	канаміцин	паромоміцин	канаміцин	паромоміцин
Частота утворення морфогенного калюсу, %	$44,9 \pm 2,9$	$51,3 \pm 2,5$	$40,3 \pm 1,3$	$48,5 \pm 2,1$
Частота регенерації, %	$18,8 \pm 0,8$	$20 \pm 1,7$	$16,5 \pm 1,4$	$18,5 \pm 1,3$
Частота трансформації, %	-	2,4	-	2,7

Примітка:  $P \leq 0,05$ .

Частина утворених пагонів характеризувалася відсутністю хлорофілу, нездатністю формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина регенерантів містила хлорофіл, однак при перенесенні на живильне середовище для вкорінення протягом 7 днів поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Як відомо, корені дуже чутливі до антибіотиків [280], однак показано, що при знижених концентраціях канаміцину (до 50 мг/л) у деяких рослин можна отримати значну кількість пагонів та коренів [10].

Подальший відбір трансформантів проводили з використанням аміноглікозидного антибіотика паромоміцину. Загалом було оброблено бактеріальною суспензією та висаджено на селективне регенераційне середовище 945 шт. первинних калюсів пшениці сорту Зимоярка та 725 шт. – сорту Подолянка. Культивування проводили за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду протягом 60-ти днів. За використання паромоміцину в якості селективного агента поява меристематичних осередків розпочиналася

значно раніше (5-10-й день культивування), ніж у випадку використання канаміцину. Окрім цього частота утворення морфогенного калюсу була вищою –  $48,5 \pm 2,1\%$  (Подольанка) та  $51,3 \pm 2,5\%$  (Зимоярка) (табл. 4.1). Після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на живильному середовищі для регенерації MCR4 (табл. 2.1), яке містило паромоміцин (100 мг/л), загалом отримано 323 регенеранти (рис. 4.1), з яких 134 – сорту Подольанка та 189 – Зимоярка.

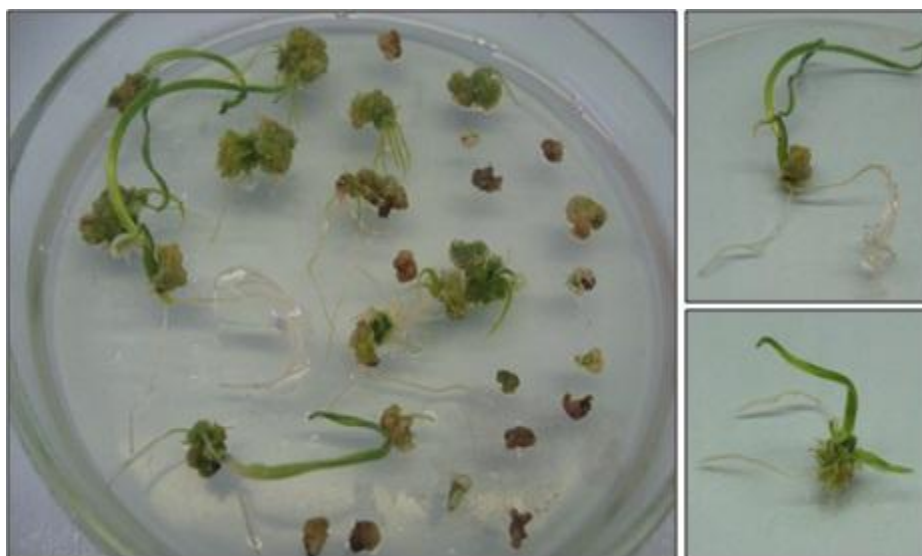


Рис. 4.1. Регенеранти пшениці, отримані після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на селективному середовищі, що містить 100 мг/л паромоміцину.

Частота регенерації у двох сортів становила  $18,5 \pm 1,3\%$  та  $20 \pm 1,7\%$  відповідно (табл. 4.1). Згодом, частина пагонів також знебарвлювалась та не формувала кореневої системи. Відібрані після первинної селекції регенеранти (29 шт. – сорту Подольанка та 32 шт. – сорту Зимоярка) переносили на середовище для вкорінення MCR2 (табл. 2.1).

З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *nptII* в регенерованих пагонах проводили аналіз за допомогою ПЛР. Згідно його результатів позитивний сигнал присутності послідовності гена – амплікон довжиною 647 п.н. (рис. 4.2) – виявлено у 20 рослин-регенерантів пшениці

сорту Подолянка та 23 – сорту Зимоярка, що становить 2,7 % та 2,4% від загальної кількості трансформованих експлантів відповідно.

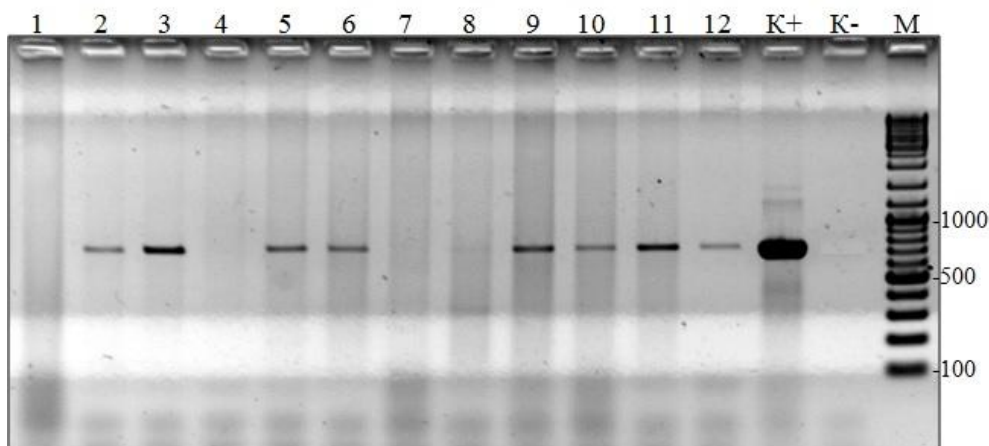


Рис. 4.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *nptII*.

Доріжки 1-12 – досліджувані зразки, K+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K- – негативний контроль – TE буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

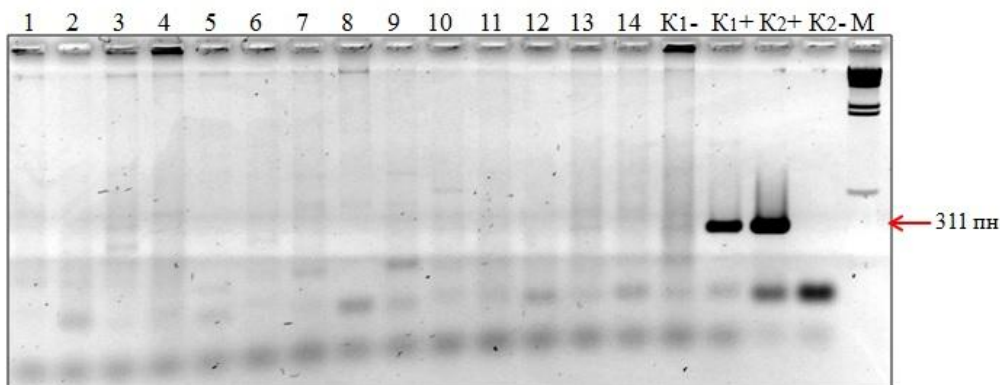


Рис. 4.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена зеленого флуоресцентного білку *sgfp*.

Доріжки 1-14 – досліджувані зразки, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці; K1+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму АВІ з генетичною конструкцією p014; K2+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014; K2- – негативний контроль – TE буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Оскільки генетична конструкція р014, якою трансформували експланти містить маркерний ген *sgfp*, то за допомогою ПЛР було проведено визначення присутності послідовності даного трансгена в рослинах, у яких попередньо виявили наявність *nptII* трансгену. За результатами аналізу послідовностей синтетичного гена зеленого флуоресцентного білку у зразках не виявлено (рис. 4.3). Це свідчить про те, що під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генетична конструкція перенеслася не цілісно – вбудувався лише ген *nptII*.

З метою виключення бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C*. Довжина очікуваного амплікона 720 п.н. (рис. 4.4).

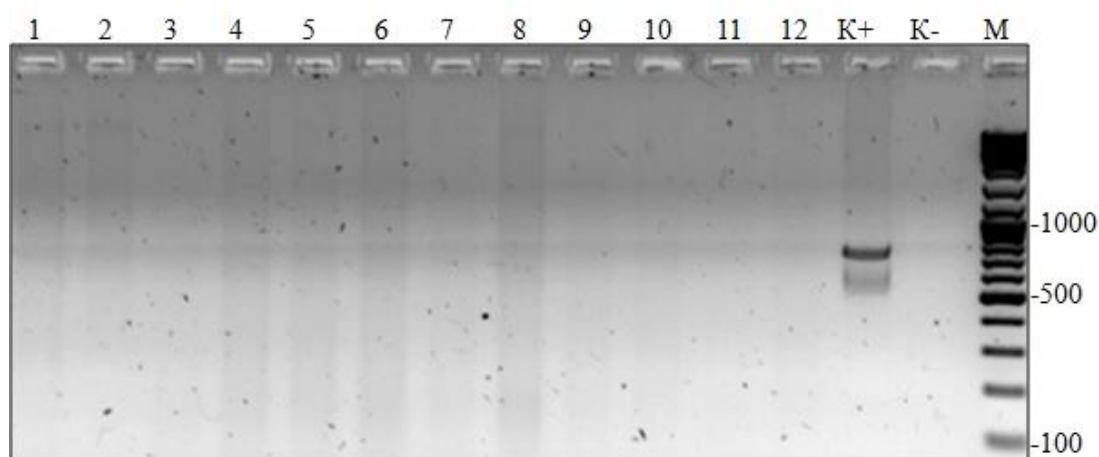


Рис. 4.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Vir C*. Доріжки 1-12 – досліджувані зразки, K+ – позитивний контроль – агробактеріальна ДНК штаму ABI, K- – негативний контроль – TE буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Опираючись на отримані результати, можна стверджувати, що інтеграція Т-ДНК генетичної конструкції р014 відбулася частково, оскільки послідовностей трансгена *sgfp* у досліджуваних зразках не виявлено.

#### 4.2. Отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до гербіциду фосфіотрицину (Баста®)

Для трансформації, опосередкованої *A. tumefaciens*, використовували генетичний вектор pCB203. Він містить гени *bar* та *gus* під контролем убіквітинового промотору. Генетичну трансформацію проводили за допомогою штаму *A. tumefaciens* GV3101.

Бактеріальною суспензією було оброблено 960 4-6-добових калюсів. Калюс отримували з незрілих зародків пшениці сорту Зимоярка (рис. 4.5).

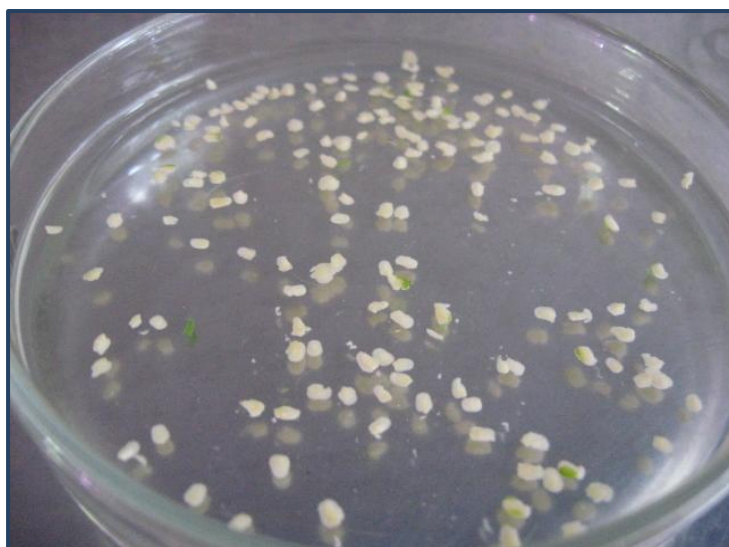


Рис. 4.5. Незрілі зародки пшениці *T. aestivum* на живильному середовищі одразу після виділення.

Після спільного культивування (15 хв.) із суспензією *A. tumefaciens* штаму GV3101 калюси переносили на регенераційне середовище MCR4 (табл. 3.1), яке містило 5 мг/л фосфіотрицину, та культивували за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду протягом 60-ти днів. Формування первинних меристематичних осередків розпочиналося на 5-й день. Відсоток утворення морфогенного калюсу в середньому складав  $68,9 \pm 2,5\%$ . На 10-у добу культивування починали з'являтися пагони (рис. 4.6).

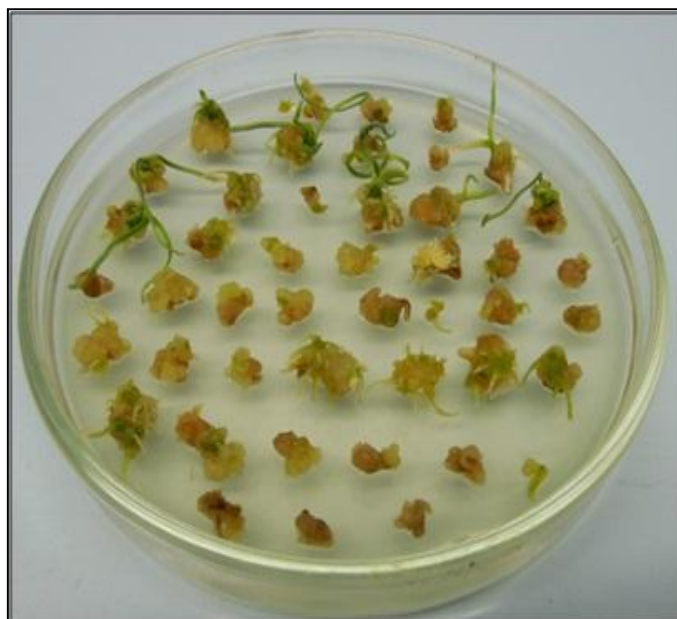


Рис. 4.6. Регенерація пшениці сорту Зимоярка після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфіотрицину.

Після первинної селекції було отримано 174 регенеранти, які переносили на середовище для вкорінення MCR2 (табл. 2.1). Частота регенерації становила  $18,1 \pm 0,6\%$ . Частина регенерантів поступово втрачала зелене забарвлення та не утворювала корені.

З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *bar* в регенерованих пагонах проводили аналіз за допомогою ПЛР. За його результатами позитивний сигнал присутності послідовності гена – амплікон довжиною 405 п.н. (рис. 4.7) – виявлено у 12 рослин-регенерантів пшениці, що становить 1,2% від загальної кількості оброблених бактеріальною суспензією експлантів.

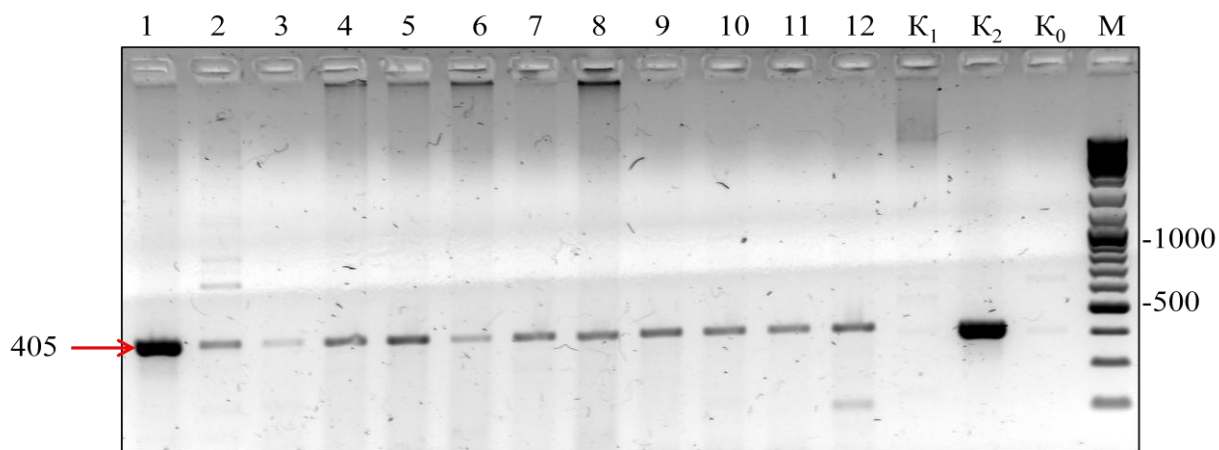


Рис. 4.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*. Доріжки 1-12 – досліджувані зразки № 2-13;  $K_1$  – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Зимоярка у якості негативного контролю;  $K_2$  – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203;  $K_0$  – негативний контроль – ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для того, щоб виключити можливість бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C* (рис. 4.8).

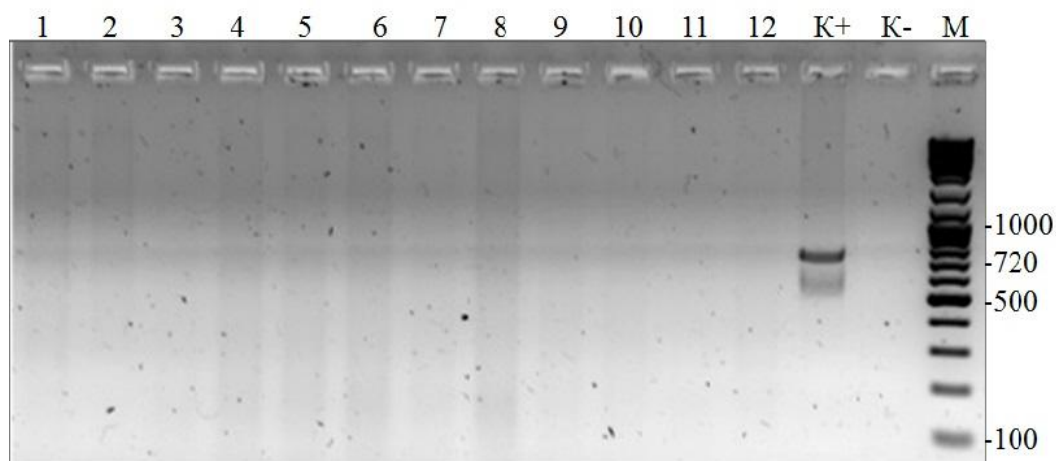


Рис. 4.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Vir C*. Доріжки 1-12 – досліджувані зразки № 2-13,  $K^+$  – позитивний контроль – агробактеріальна ДНК штаму GV3101,  $K^-$  – негативний контроль – ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Результати аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (рис. 4.7) свідчать про відсутність бактерії в рослинних зразках та дозволяють стверджувати, що відбулася інтеграція трансгену в рослинний геном.

Також була проведена трансформація 18-добового калюсу апікального походження обох сортів (Подольянка та Зимоярка). У дослідження було залучено 1750 шт. калюсу сорту Подольянка та 2145 шт. – сорту Зимоярка. Після ко-культивування (48 год.) з бактеріальними клітинами *A. tumefaciens* штаму GV3101 на селективному культуральному середовищі MCR4 (табл. 2.1), доповненому 5 мг/л фосфінотрицину сформувалося 298 (частота регенерації –  $17\pm 1,1\%$ ) та 412 (частота регенерації –  $19,2\pm 0,7\%$ ) пагонів відповідно (табл. 4.2). Отримані регенеранти переносили на середовище для вкорінення MCR2 (табл. 2.1).

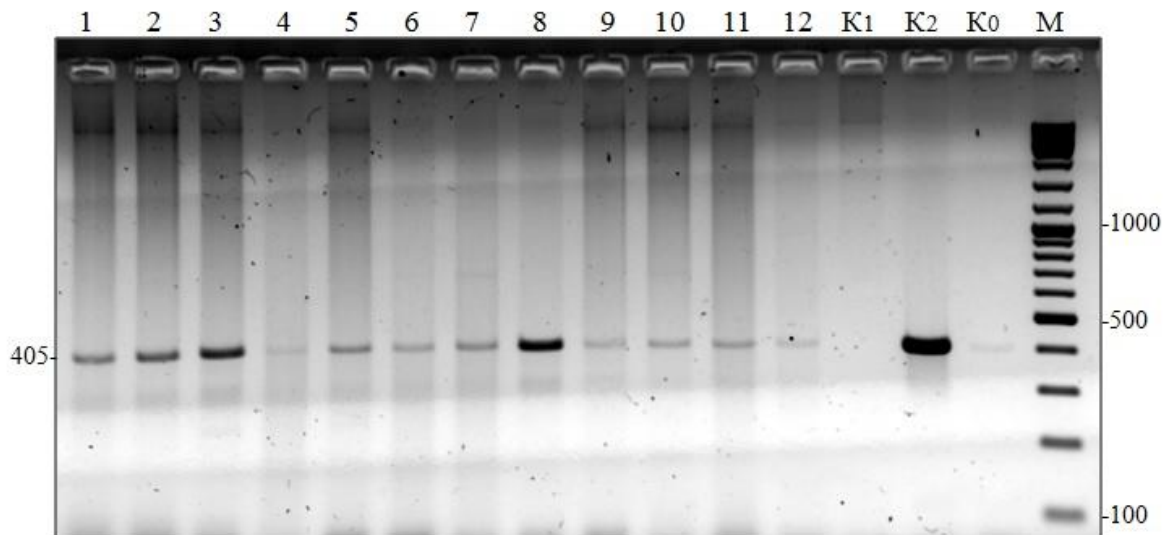
Таблиця 4.2

Частота трансформації калюсу пшениці апікального походження за використання *A. tumefaciens* штамів ABI та GV3101

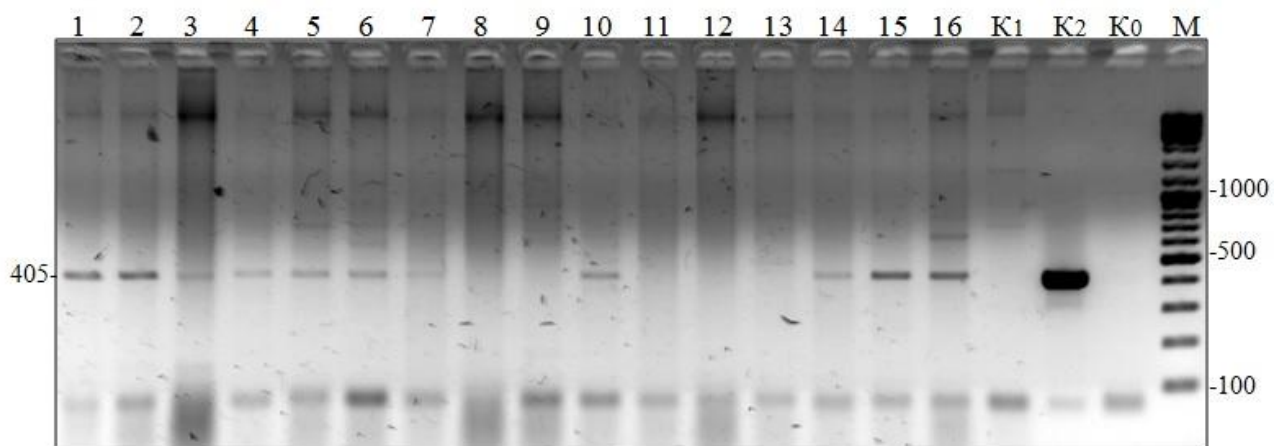
<i>A. tumefaciens</i>	ABI (p014)		GV3101 (pCB203)	
	Зимоярка	Подольянка	Зимоярка	Подольянка
Частота утворення морфогенного калюсу, %	51,3 $\pm$ 2,5	48,5 $\pm$ 2,1	55,7 $\pm$ 1,6	51,3 $\pm$ 1,5
Частота регенерації, %	18,8 $\pm$ 0,8	16,5 $\pm$ 1,4	19,2 $\pm$ 0,7	17 $\pm$ 1,1
Частота трансформації, %	2,7	2,4	1,6	1,8

Аналіз регенерантів на присутність генетичної послідовності гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) проводили, за допомогою ПЛР та специфічних праймерів (табл. 2.2, рис. 4.9).

Використовуючи калюс апікального походження, загалом за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано 31 трансгенну рослину пшениці сорту Подольянка та 34 сорту Зимоярка.



**А**



**Б**

Рис. 4.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*. Доріжки 1-12 – досліджувані зразки № 7-18 сорту Зимоярка (А), 1-16 – досліджувані зразки № 18-34 сорту Подолянка (Б); К<sub>1</sub> – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Зимоярка (А) та сорту Подолянка (Б) у якості негативного контролю; К<sub>2</sub> – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією рСВ203; К<sub>0</sub> – негативний контроль – ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Відповідно частота трансформації становила 1,8% для сорту Подолянка та 1,6% для сорту Зимоярка. Трансгенна природа всіх отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами специфічними до *bar* гена.

Таким чином, у результаті проведеної роботи удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин пшениці.

Загально відомо, що значний вплив на процес *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації має щільність бактеріальної суспензії ( $OD_{600}$ ). Її оптимальне значення для різних штамів, культур та генотипів дещо відрізняється. За літературними даними найвища частота трансформації пшениці спостерігалася при  $OD_{600} = 0,5 - 4,4 \%$  [94] або  $12,5 \%$  [146]. В нашому дослідженні за оптичної щільності *A. tumefaciens*  $OD_{600} = 0,4$  вдалося отримати трансформовані рослини пшениці сортів Зимоярка та Подолянка.

У більшості культур під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації виникає проблема ефективного відбору трансформантів шляхом застосування селективної системи з використанням канаміцину [284]. Летальна доза даного антибіотика залежить від генотипу рослини та типу експлантів, які використовуються. У нашій роботі за використання канаміцину отримати трансформанти не вдалося, тому антибіотик канаміцин був замінений на паромоміцин, який характеризується м'якшою дією на рослинний організм. Даний антибіотик, який відноситься до групи аміноглікозидів, успішно застосовується для відбору трансгенних рослин тютюну, рису, вівса та каучуку за геном *nptII* [225, 282, 285-287]. Вважається, що використання *Rm* для селекції трансформантів, які містять ген *nptII*, може бути перспективним у випадку тих видів, для яких *Km* має сильний негативний вплив, зокрема, види *Brassica* [14] та злаків [280-281]. За використання паромоміцину як селективного агента після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації нами отримано 23 трансформанти сорту Зимоярка та 20 – сорту Подолянка, відповідно частота трансформації складала  $2,7\%$  та  $2,4\%$ .

За використання вектора pCB203 (селективний агент фосфінотрици) з калюсу, отриманого з незрілих зародків одержано 12 трансформованих рослин пшениці сорту Зимоярка – частота трансформації складає  $1,2\%$ . З калюсу

апикального походження сформувалося 34 лінії сорту Зимоярка (частота трансформації 1,6%) та 31 – сорту Подолянка (частота трансформації 1,8%).

Трансгенна природа всіх отриманих рослин підтверджена за допомогою методу ПЛР за використання специфічних праймерів.

## РОЗДІЛ 5

### **AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ МЕТОДОМ *IN PLANTA***

#### **5.1. Оптимізація методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці *T. aestivum* сорту Подолянка**

На даний час все більш привабливим стає метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, оскільки він дозволяє уникнути використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів, та дозволяє уникнути соматональної мінливості, яка зустрічається під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro* [184-185]. Показано, що частота трансформації рису та пшениці м'якої за допомогою даного методу є значно вищою у порівнянні з іншими методами генетичної трансформації [98, 112, 187, 208, 288-290]. Метод отримання біотехнологічних рослин *in planta* успішно використовується для різних сільськогосподарських культур, включаючи овочеві (редис, помідори і перець) [8, 190-191] та злаки (пшениця, кукурудза, рис) [187, 192-194].

Ефективність трансформації за допомогою будь-якого методу залежить від ряду специфічних факторів. Одними із таких для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* виступають умови навколишнього середовища, які включають температурний режим, вологість повітря, наявність чи відсутність опадів. Як відомо оптимальний температурний показник для нормальної експресії *vir*-генів *A. tumefaciens* знаходиться в діапазоні від 18 °C до 28 °C. Окрім цього, на ефективність трансформації за допомогою даного методу часто впливає час контакту тканин рослини з *Agrobacterium* та умови приготування бактеріальної суспензії.

Для досліджень 2013-2014 рр. використовували штам АВІ *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією p014, до складу Т-ДНК якої входить ген *nptII* і *sgfp*. Бактерію нарощували у рідкому середовищі Himedia M002 [98] з відповідними антибіотиками (Spc 50 мг/л та Km 100 мг/л) на шейкері

протягом 16 годин. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв. протягом 10 хв. і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності  $OD_{600}=1,0$  [98, 175, 177, 185]. До суспензії бактерій додавали 100  $\mu\text{M}$  ацетосірінгон [175, 177] та 0,05% Silvet L77 [8], рН доводили до 4,0.

Колоси кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією. Запилення проводили пилком, отриманим з іншого колосу тієї ж рослини, відповідно до методики (див. розділ 2). Середня довжина колоса складала 5,9 см.

Після завершення вегетаційного періоду з прокастрованих та оброблених агробактеріальною суспензією колосів отримано 293 насінини. Таким чином, середня зав'язуваність насіння складала  $46,4 \pm 2,4\%$ , контроль (середовище для інокуляції) –  $31,5 \pm 1,6\%$ .

Отримане насіння відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Типовий колос та насіння, отримане після обробки агробактеріальною суспензією *in planta*.

Все отримане насіння  $T_0$  висівали у ґрунт: частину зерен  $T_0$  висаджували у вегетаційні посудини і культивували в умовах теплиці за температури  $+22^\circ\text{C}$  і 16-годинного фотоперіоду, частину вирощували в умовах мікроділянкового досліду. Після того, як рослини  $T_0$  досягли фази двох листків, частину одного з листків зрізали для проведення ПЛР-аналізу.

Серед проаналізованих 175 рослин  $T_0$  тільки у дев'яти (5,1 %) виявлено позитивний сигнал присутності послідовності гена *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. (рис. 5.2).

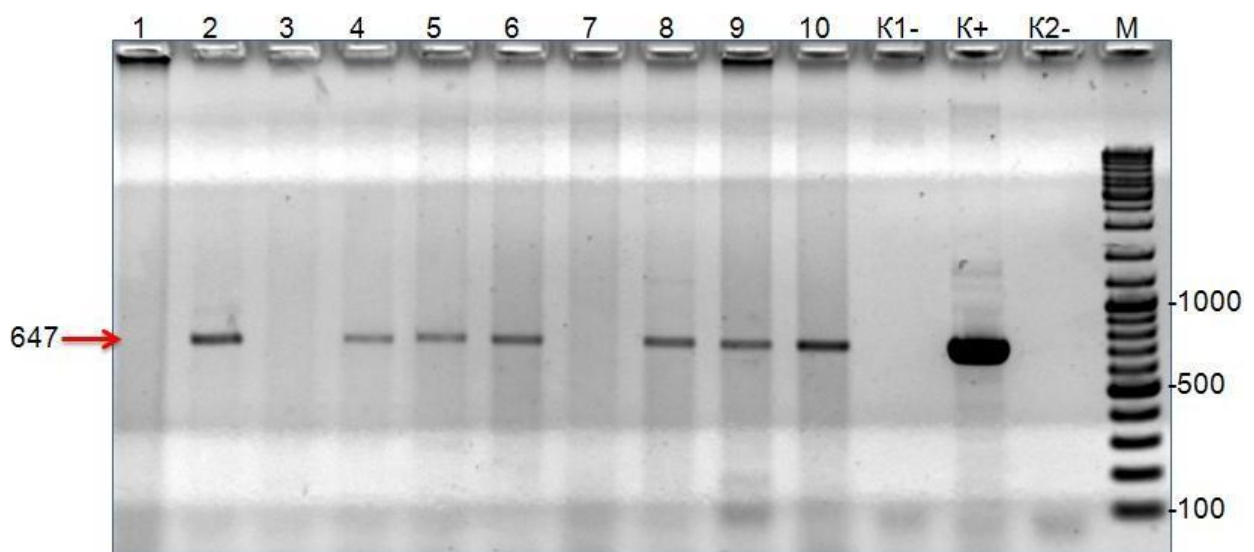


Рис. 5.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *nptII*.

Доріжки 1-10 – досліджувані зразки, K1- – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Подолянка у якості негативного контролю, K+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K2- – негативний контроль – TE буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

За допомогою ПЛР проводили визначення наявності послідовностей синтетичного гена зеленого флуоресцентного білку (*sgfp*) у відібраних рослинах, в яких попередньо виявили присутність *nptII* трансгену. У досліджуваних 9-ти зразків присутність послідовності гена *sgfp* – амплікон

довжиною 311 п.н. – виявлена тільки у 4-х, що складає 2,3 % від протестованих 175 рослин (рис. 5.3).

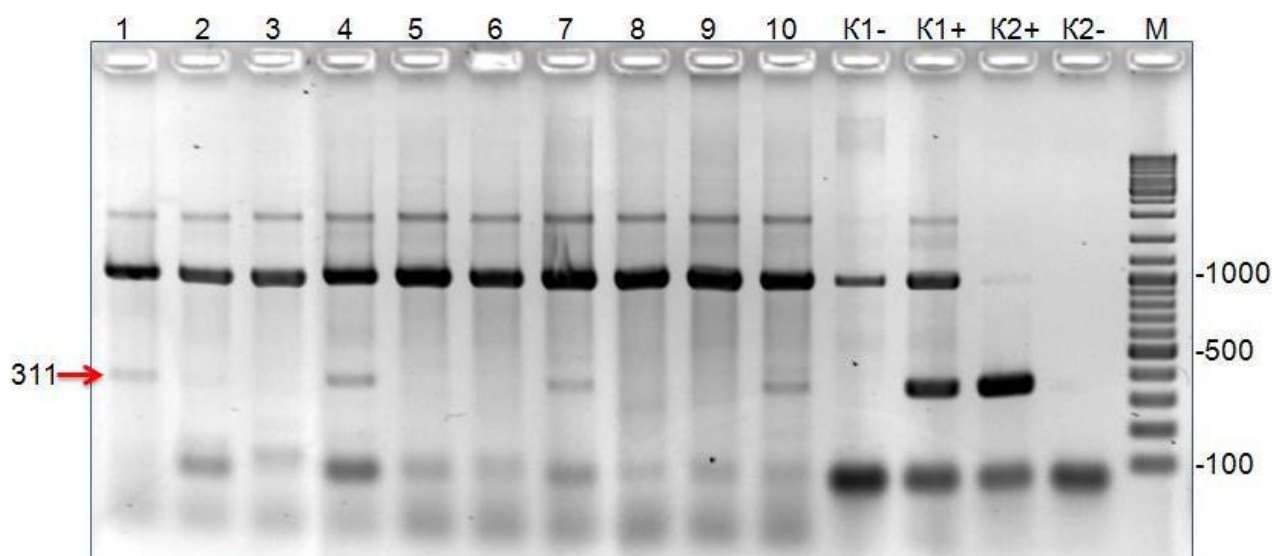


Рис. 5.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гену зеленого флуоресцентного білку *sgfp*.

Доріжки 1-10 – досліджувані проби, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці, K1+ – позитивний контроль – ДНК пшениці, яка містить послідовність трансгену *sgfp*; K2+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K2- – негативний контроль – TE буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для досліджень 2015 року крім штаму АВІ використовували штам GV3101 *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією pCB203, Т-ДНК якої включала послідовності генів *gus* та *bar*. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* отримували за методикою Сидорова [225] з певними модифікаціями: з інокуляційного середовища повністю виключали сахарозу, оскільки за нашими спостереженнями 2013-2014 рр., а також опираючись на дослідження О. М. Гончарука, А. В. Бавола і О. В. Дубровної показано, що сахароза є хорошим субстратом для розвитку сапрофітної мікрофлори, що заважає нормальному процесу запилення/запліднення та

знижує ефективність процесу трансформації [291]. Оптична щільність використаної суспензії була  $OD_{600}=1,0$ .

Після застосування модифікованого інокуляційного середовища під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* все отримане насіння (200 зерен) висівали в ґрунт. Для аналізу на наявність трансгенів було відібрано 145 рослинних зразків (частина листка рослини). З них присутність генетичної послідовності трансгена *nptII* детектовано у 30 зразках (рис. 5.4). Частота трансформації становить 20,7% від загальної кількості відібраних зразків.

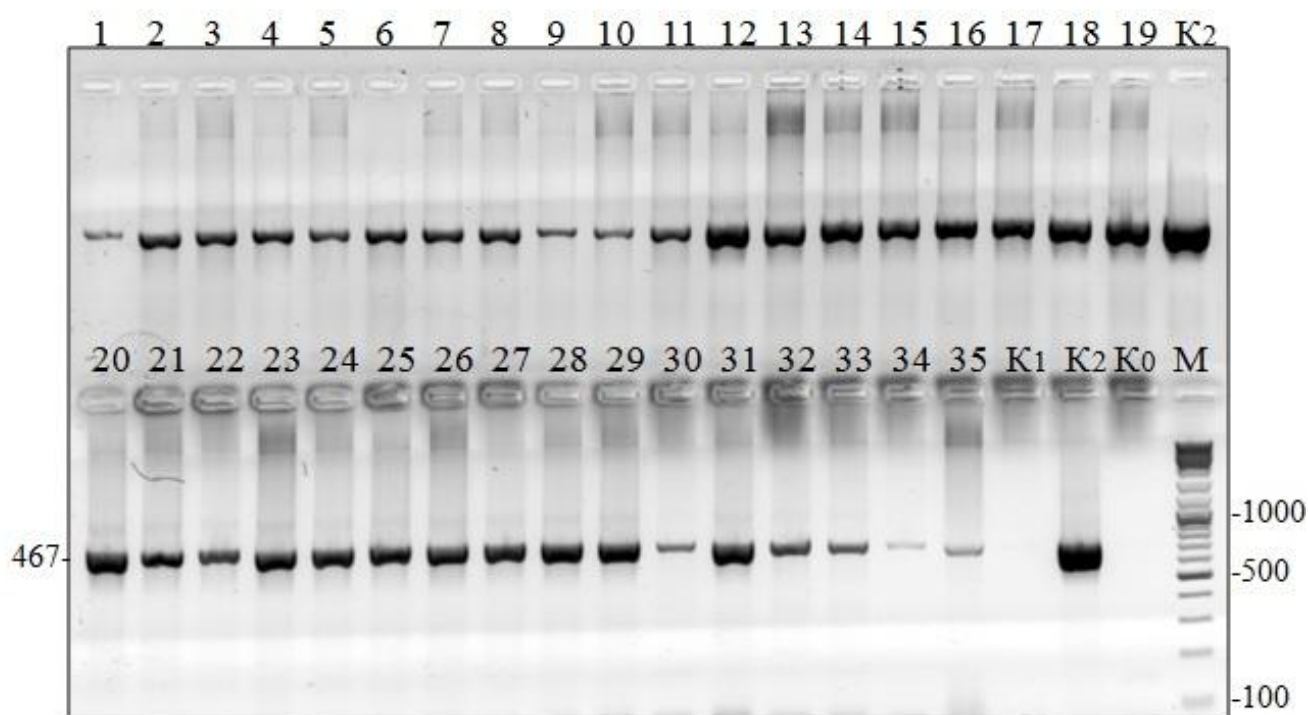


Рис. 5.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *nptII*.

Доріжки 1-35 – досліджувані зразки, K1 – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Подолянка у якості негативного контролю, K2 – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K0 – негативний контроль – TE буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для того, щоб виключити можливість бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності агробактерій, а саме *Vir C* (рис. 5.5).

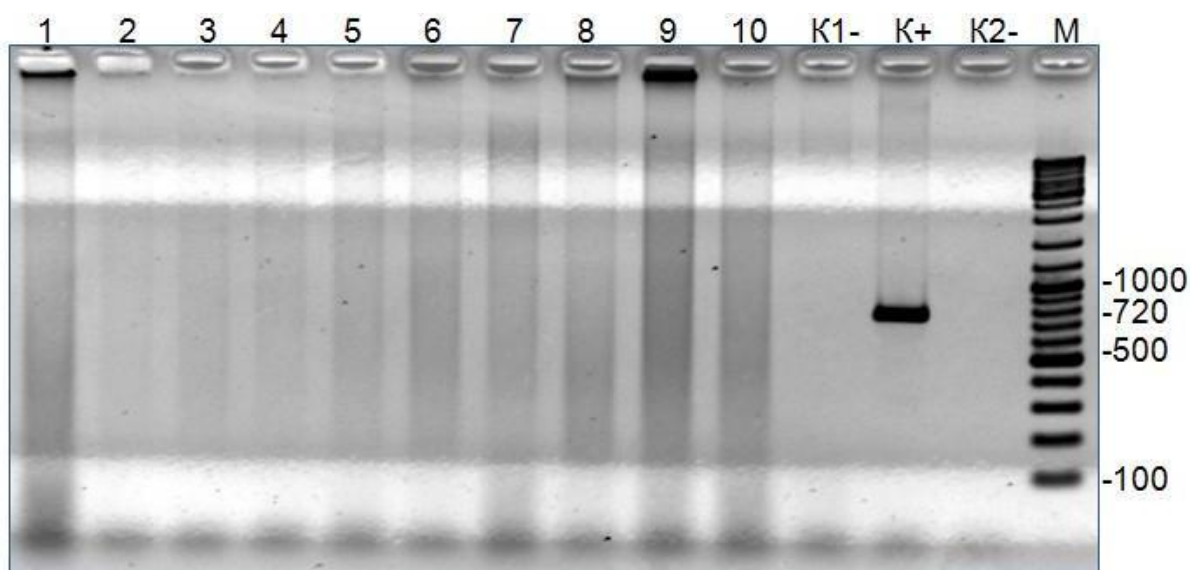


Рис. 5.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Vir C*.

Доріжки 1-10 – досліджувані зразки, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці, K+ – позитивний контроль – ДНК агробактеріального штаму ABI, K2- – негативний контроль – ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Результати полімеразної ланцюгової реакції (рис. 5.5) свідчать про відсутність бактеріального зараження трансформантів за умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та дозволяють стверджувати, що Т-ДНК вбудувалась в рослинний геном.

За допомогою методу *in planta* у 2013-2014 рр. одержано 9 рослин пшениці, трансгенних за обома генами – *nptII* та *sgfp*. Частота трансформації складала 2,3%. Після застосування модифікованого середовища для інокуляції отримано 30 рослин *T. aestivum*, трансгенних за геном *nptII*. Частота трансформації – 20,7%. Таким чином, оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та доведено

можливість отримання трансформантів пшениці *Triticum aestivum* сорту вітчизняної селекції Подолянка методом *in planta*.

Одним із важливих факторів, які впливають на процес агробактеріальної трансформації *in planta* та його ефективність є температура навколишнього середовища [194, 203, 208]. Нами встановлено, що за температури +18-20°C відбувається генетична трансформація пшениці сортів Подолянка та Зимоярка за використання методу *in planta* [292].

## **5.2. Отримання біотехнологічних рослин пшениці м'якої сорту Подолянка, стійких до фосфіотрицину, методом *in planta***

Для агробактеріальної трансформації *in planta* використовували рослини пшениці сорту Подолянка. Проведено 4 серії експериментів за різної температури та вологості навколишнього середовища:

- 1) t=24 °C, вологість 44%;
- 2) t=24 °C, вологість 69%;
- 3) t=16 °C, вологість 79%, дощ;
- 4) t=27 °C, вологість 41%.

Відібрані колоси (112 шт.) кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією відповідно до оптимізованої методики. Середня довжина колоса становила 6,3 см. У дослідженні використовували *A. tumefaciens* штаму GV3101, який містив генетичну конструкцію pCB203. Для запилення у варіантах № 2-4 використовували пилок з іншого колосу тієї ж рослини, а рослини у варіанті № 1 запилювали пилом високопродуктивного сорту Сонечко через відсутність квітучих колосів сорту Подолянка.

Після періоду вегетації заголом зібрано 89 колосів та отримано 348 зернівок (табл. 5.1). Максимальну кількість зернівок (191 шт.), яка відповідає найбільшому відсотку зав'язуваності (40,6±0,7%) одержано з рослин варіанту №1. В даному випадку умови дослідження (навколишнього середовища) були наближеними до оптимальних. Контрольними були колоси, оброблені

середовищем для інокуляції та запилені пилком сорту Сонечко. Зав'язуваність у контролі була  $16,5 \pm 0,9\%$ .

У варіанті № 3 отримано найменшу кількість зерен (42 шт. разом з контролем), що відповідає зав'язуваності  $8,1 \pm 1,6\%$ . Погодні умови для даного дослідження характеризувалися низькою температурою ( $t=16\text{ }^\circ\text{C}$ ) та високою вологістю. Для запилення використовували пилок цього ж сорту. У варіанті №4, де  $t=27\text{ }^\circ\text{C}$  зав'язуваність була значно більшою у порівнянні з варіантом №3. Таким чином, зниження температури у поєднанні з опадами більш негативно впливає на запилення, ніж її підвищення.

Опираючись на отримані дані, можна стверджувати, що зав'язуваність у пшениці залежить від температури та вологості повітря.

З метою визначення залежності ефективності трансформації від умов навколишнього середовища все отримане насіння висівали у ґрунт для подальшого аналізу. З рослин, які вийшли у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК та виявлення послідовності трансгена *bar*. Загалом було відібрано 545 зразків.

За результатами ПЛР-аналізу наявність генетичної послідовності детектовано у 85 зразках (рис. 5.6). Ефективність трансформації за трансгеном *bar* складала  $15,6\%$  від загальної кількості відібраних зразків.

Під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* одним із ключових факторів, що впливають на її ефективність виступають погодні умови. За літературними даними під час обробки бактеріальною суспензією більш сприятливими є  $18\text{-}20\text{ }^\circ\text{C}$ , порівняно з  $22\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$  [192]. Однак, отримані нами дані свідчать про те, що температурний режим  $t \approx 24\text{ }^\circ\text{C}$  (варіант №1) забезпечує отримання максимальної кількості ( $7,3\%$ ) трансформантів. У варіанті №2, де температура була  $24\text{ }^\circ\text{C}$  отримано менше трансформованих рослин ( $5,5\%$ ). Можливо така відмінність спричинена тим, що під час запилення було використано пилок різних сортів. Вологість повітря, у даному випадку, становила  $69\%$ .

Таблиця 5.1.

Залежність зав'язуваності насіння сорту Подолянка від умов навколишнього середовища

Варіант	1		2		3		4	
Генетична конструкція	pCB203	Конт.	pCB203	Конт.	pCB203	Конт.	pCB203	Конт.
Кількість зернівок	191	21	92	14	42	0	23	80
Довжина колоса, см	6,8±0,5	7,6±0,2	6,8±0,3	7,5±0,6	6,4±0,5	7,5±0,4	5,4±0,3	6,4±0,6
% зав'язуваності	40,6±0,7	16,5±0,9	37,2±0,5	11,5±1,1	8,1±1,6	0	32,9±1,3	27,3±1,5

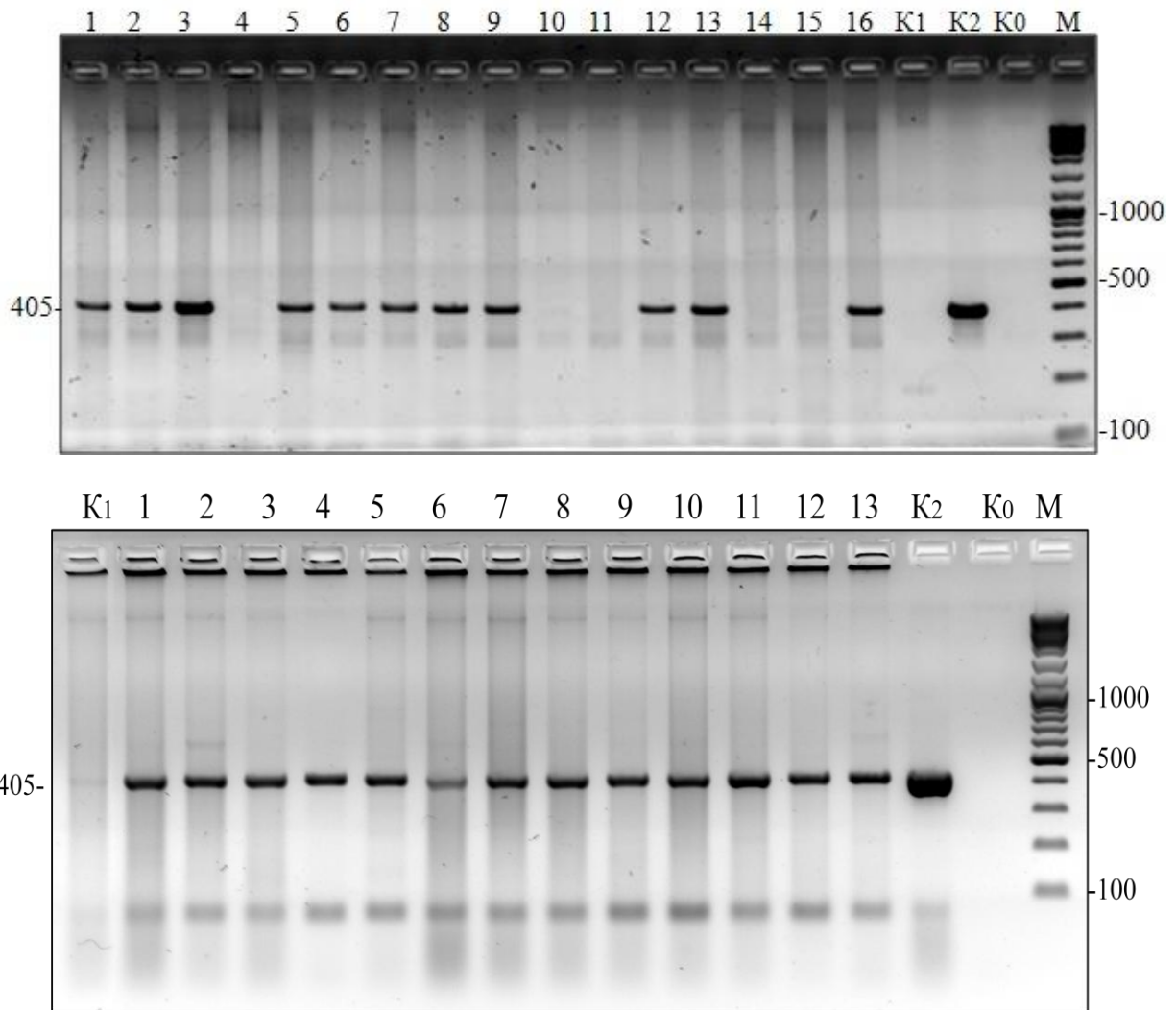


Рис. 5.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*.

Доріжки 1-16 – досліджувані зразки;  $K_1$  – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Зимоярка у якості негативного контролю;  $K_2$  – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203;  $K_0$  – негативний контроль – TE буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

При зниженні температури до 16-18 °С відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Тому, у варіанті №3 спостерігається найменший відсоток трансформації (0,5%). Крім цього зменшення ефективності отримання трансгенних рослин у цьому варіанті, на нашу думку, було спричинене опадами. При підвищенні температури до

27 °С (варіант №4) частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2%. Ймовірно це пов'язано із утворенням *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК і для яких високі температурні показники є критичними [194].

Зразки, у яких виявили присутність послідовності трансгена *bar* перевіряли на наявність агробактерій шляхом детекції генів вірулентності (*Vir C*) (рис. 5.7).

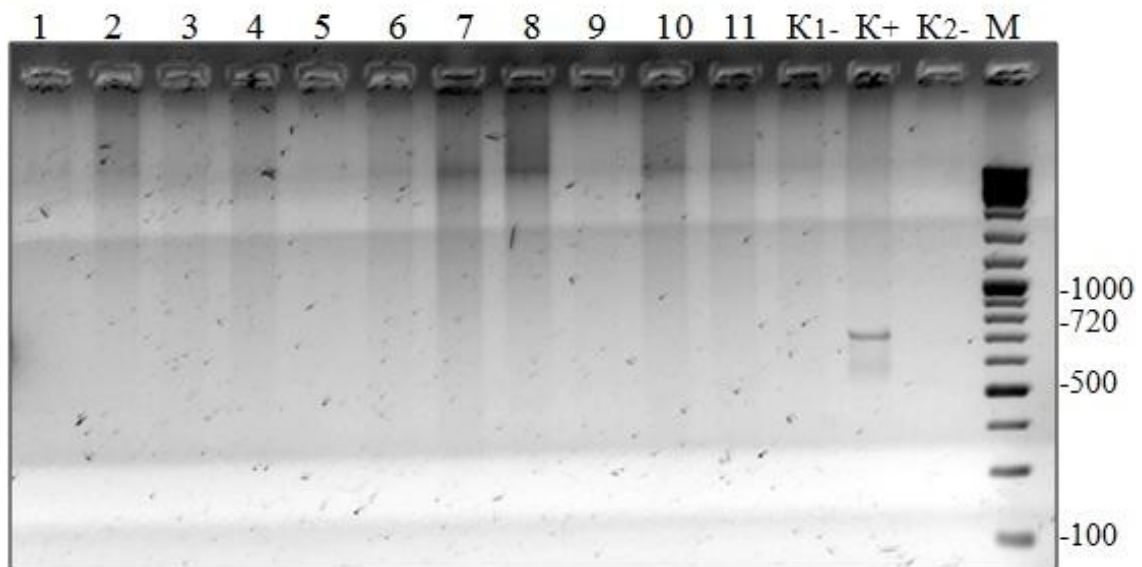


Рис. 5.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Vir C*.

Доріжки 1-11 – досліджувані зразки, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці, K+ – позитивний контроль – ДНК агробактеріального штаму GV3101, K2- – негативний контроль – ТЕ буфер, M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Результати аналізу (рис. 5.7) свідчать про відсутність агробактеріального зараження у досліджуваних зразках.

Таким чином, нами підтверджено твердження О. М. Гончарука, А. В. Бавола і О. В. Дубровної [291] про негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Так, за її наявності в інокуляційному середовищі

частота трансформації за генами *nptII* та *sgfp* складала 2,3%. Використовуючи методику генетичної трансформації за Сидоровим [225] з певними модифікаціями (відсутність в середовищі для інокуляції сахарози) отримано трансформанти за генами *bar* (15,6%) та *nptII* (20,7%). Наявності послідовності трансгена *sgfp* у відібраних зразках не виявлено, що свідчить про повне вбудування генетичної конструкції.

Встановлено, що температурний режим  $t \approx 24^\circ\text{C}$  та низька вологість повітря (44%) під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* сприяє зав'язуваності насіння  $40,6 \pm 0,7\%$  та дає можливість отримати трансформанти (7,3%). Зниження температури навколишнього середовища або її підвищення негативно впливає на частоту трансформації. Таким чином доведена можливість отримання трансгенних рослин пшениці сорту Подолянка за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

### **5.3. Дослідження експресії трансгенів у рослинах пшениці *T. aestivum***

Дослідження експресії трансгенів *nptII* та *bar* у рослинах пшениці сорту Подолянка здійснювали на рівні транскрипції. Для цього проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Загальну РНК виділяли з листків трансгенних рослин та обробляли дезоксирибонуклеазою I, вільною від рибонуклеаз відповідно до методики [293]. Виділена РНК трансгенних рослин пшениці була використана для синтезу кДНК. З метою виявлення домішок ДНК в препаратах РНК, проводили ПЛР-аналіз з використанням відповідних праймерів, специфічних до референтного гену пшениці TaG3PDH (табл. 2.2, рис. 5.8), а також генів *nptII* (табл. 2.2, рис. 5.9) та *bar* (табл. 2.2, рис. 5.10). В якості позитивного контролю використовували рослини тютюну *N. tabacum*, трансформовані векторами p014 та pCB203.

Відсутність сигналу на доріжках 2, 4, 6 та 8 (рис. 5.9) та 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 та 16 (рис. 5.10) вказує на чистоту РНК-препаратів. ПЛР-аналіз

синтезованої в ході реакції зворотної транскрипції кДНК показав наявність експресії гена *nptII* у всіх зразках (рис. 5.9), а гена *bar* у 50% відібраних зразків (рис. 5.10).

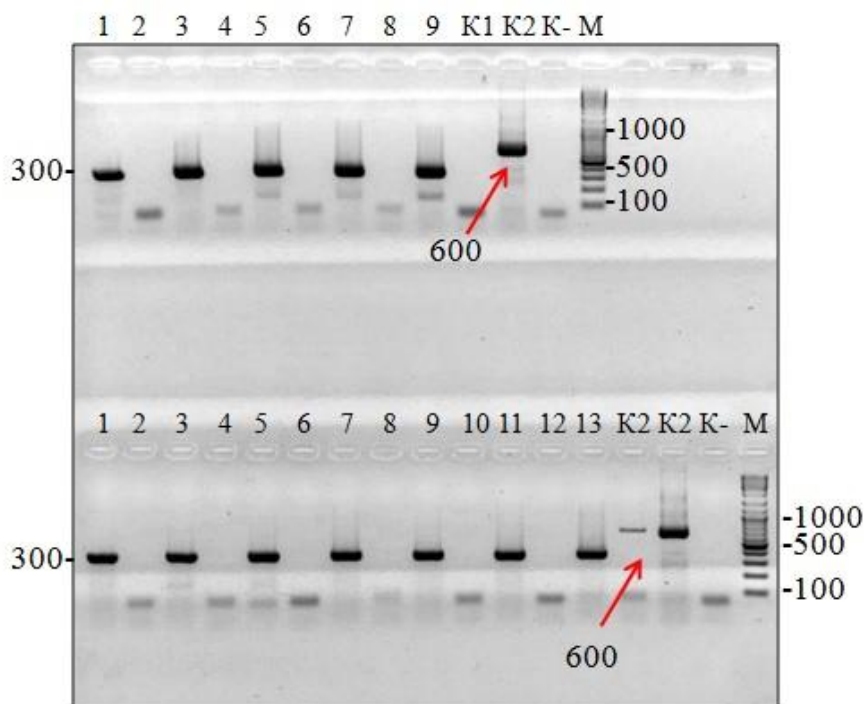


Рис. 5.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена TaG3PDH (кДНК, синтезована за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин пшениці).

Доріжки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту Подолянка; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання реверсивної транскриптази); K1 – негативний контроль (кДНК, синтезована з РНК нетрансгенної рослини); K2 – позитивний контроль (кДНК, синтезована з РНК трансгенної рослини *N. tabacum*); K- – негативний контроль – TE буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

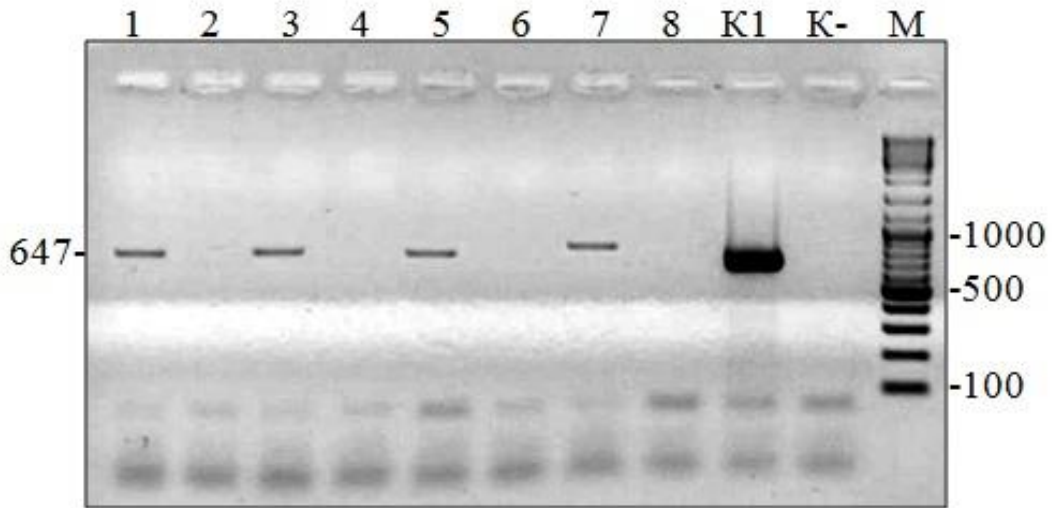


Рис. 5.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *nptII* (кДНК, синтезована за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин пшениці).

Доріжки 1, 3, 5, 7 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту Подолянка; 2, 4, 6, 8 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання реверсивної транскриптази); K1 – позитивний контроль (кДНК, синтезована з РНК трансгенної рослини *N. tabacum*, трансформованої плазмідом р014); K- – негативний контроль – ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

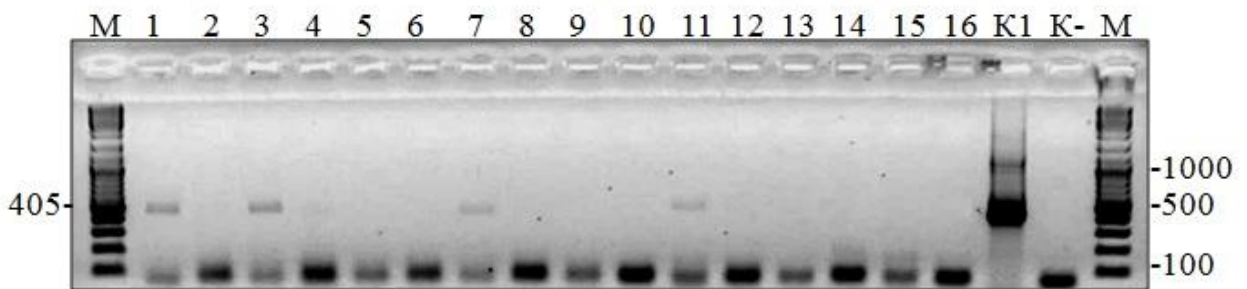


Рис. 5.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *bar* (кДНК, синтезована за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин пшениці).

Доріжки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту Подолянка; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання реверсивної транскриптази); K1 – позитивний

контроль (кДНК, синтезована з РНК трансгенної рослини *N. tabacum*, трансформованої плазмідною рСВ203); К- – негативний контроль – ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Таким чином, підтверджено експресію генів *nptII* та *bar* в трансгенних рослинах пшениці сорту Подолянка, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та *in vitro*.

Рослини пшениці, які за результатами ПЛР-аналізу містять ген *bar* досліджували на стійкість до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфинотрицин). Для цього їх обробляли розчином гербіциду у кількості 0,5; 1 та 1,5 мг/мл. Рекомендованою виробником є концентрація 1,5 мг/мл. Як контроль використовували нетрансформовані рослини пшениці. Про експресію гена *bar* свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду. За результатами фізіологічного тесту серед проаналізованих рослин стійкість проявляли 25% від загальної кількості досліджуваних рослин (рис. 5.11).

Таким чином, підтверджено експресію генів *nptII* та *bar* в трансгенних рослинах пшениці сорту Подолянка, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та *in vitro*.

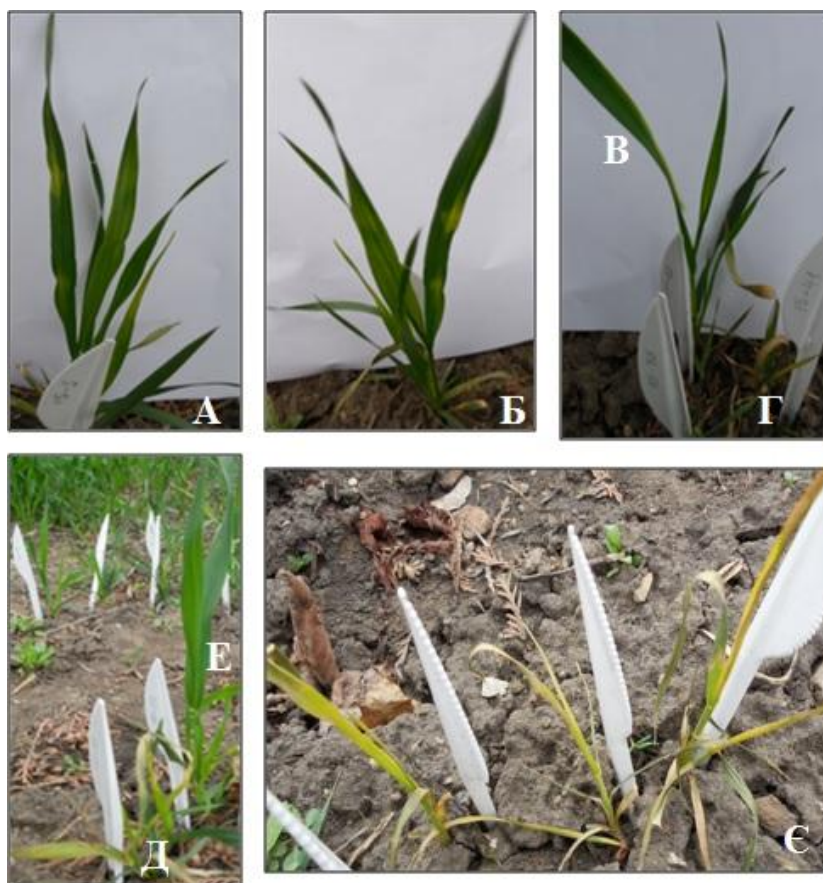


Рис. 5.11. Рослини пшениці сорту Подолянка оброблені гербіцидом Баста® у концентрації, рекомендованій виробником (1,5 мг/мл): А, Б, В, Е – рослини, стійкі до гербіциду; Г, Д, Є – нетрансформовані рослини пшениці (контроль).

У результаті проведеної роботи:

- оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, в результаті чого частота трансформації пшениці зросла до 20,7%. Доведено можливість отримання трансформантів пшениці *Triticum aestivum* сорту вітчизняної селекції Подолянка даним методом;
- підтверджено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на процес трансформації методом *in planta*;
- показано залежність ефективності зав'язуваності насіння та частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* після

*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму;

- трансгенна природа рослин пшениці, отриманих в культурі *in vitro* та методом *in planta* доведена за допомогою ПЛР, ЗТ-ПЛР та фізіологічного тесту.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

У роботі було оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *T. aestivum* в культурі *in vitro* та методом *in planta*, а також отримано трансгенні рослини пшениці сортів Подолянка та Зимоярка, стійкі до канаміцину та гербіциду фосфінотрицину (Баста®).

Для культури *in vitro* підбрано компоненти живильного середовища (середовище MCR4), які підвищують частоту регенерації пагонів у пшениці до 35%. Утворені на такому культуральному середовищі рослини здатні адаптовуватися до ґрунтових умов та характеризуються високою життєздатністю.

Розроблено ефективну систему елімінації клітин *A. tumefaciens* штамів ABI та GV3101, яка передбачає використання антибіотиків β-лактамної групи тиментину та цефтриаксону. Оскільки відомо, що вплив антибіотиків на рослинний організм може бути як позитивним, так і негативним, то досліджували дію тиментину та цефтриаксону на морфогенетичні процеси у пшениці. За отриманими результатами частота пагоноутворення у пшениці залежить від типу та концентрацій антибіотика у культуральному середовищі та генотипу – для стимуляції регенераційних процесів у різних генотипів пшениці потрібно індивідуально підбирати концентрації антибіотиків. Утворення морфогенного калюсу залежить тільки від генотипу. Наявність антибіотиків може пришвидшувати процес утворення меристематичних осередків, але на частоту їх утворення не впливає. Наявність антибіотиків у живильному середовищі стимулює ризогенез. Утворення коренів відбувається за будь-якої їх кількості. Таким чином, ризогенез залежить від наявності/відсутності антибіотика, а також від генотипу.

За тривалого культивування калюсів на живильному регенераційному середовищі MCR4, доповненому цефтриаксоном, регенерація відбувається за типом прямого органогенезу, в місці прикріплення пагона до калюсної тканини формуються корені. Це дає можливість отримати рослину-регенерант без етапу вкорінення на спеціальному середовищі та може

зменшити коштовність процесу отримання біотехнологічних рослин *T. aestivum*.

У роботі досліджували можливість використання антибіотиків тиментину та цефтриаксону як самостійних екзогенних регуляторів росту пшениці. Для цього досліджували їхню дію на утворення морфогенного калюсу і регенерацію пагонів сортів Подолянка та Зимоярка без залучення інших екзогенних регуляторів росту. Тиментин проявляв ауксиноподібні властивості: за його наявності у живильному безгормональному середовищі спостерігали інтенсивний ризогенез. Цефтриаксон стимулював утворення пагонів без участі екзогенних фітогормонів та сприяв розвитку коренів у них. Частота регенерації пагонів на безгормональному живильному середовищі МС, доповненому цефтриаксоном, була майже в два рази вищою (близько 85%) порівняно із частотою регенерації на середовищі МСР4 з додаванням цього ж антибіотику (40-60%), а ефективність регенерації становила 2-3 пагони на один морфогенний експлант. Відповідно до цього можна стверджувати, що антибіотики β-лактамної групи тиментин та цефтриаксон мають властивості регуляторів росту, однак тиментин може бути використаний лише як додатковий стимул морфогенетичних процесів у пшениці, а цефтриаксон, з одного боку, може підсилювати дію інших фітогормонів, а з іншого – бути використаний як самостійний регулятор.

Використовуючи оптимізоване живильне середовище для регенерації та розроблену систему усунення бактеріальної контамінації проводили *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію калюсної культури пшениці *in vitro* генетичними векторами p014 та pCB203. У випадку вектора p014 використання канаміцину як селективного агента негативно впливає на утворення пагонів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*, в той час, як паромоміцин дозволяє отримати трансформанти сортів Подолянка (2,7%) та Зимоярка (2,4%). Після використання вектора pCB203 (селективний агент фосфінотрицин) частота трансформації калюсу, одержаного з незрілих зародків пшениці сорту Зимоярка, складає 1,2%, а з

калюсу апікального походження – 1,6% (сорт Зимоярка) та 1,8% (сорт Подолянка), це свідчить про однакову ефективність використання калюсу пшениці м'якої різного походження для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але калюси, отримані з апікальних меристем пагона, доступні для використання впродовж цілого року, що робить їх більш привабливими для отримання трансформантів пшениці.

На сьогодні все більш розповсюдженим стає метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Він дозволяє зменшити собівартість та довготривалість експериментів, а також уникнути соматональної мінливості, яка трапляється під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro*. Під час оптимізації методики трансформації *in planta* вдосконалювали окремі елементи отримання біотехнологічних рослин пшениці. Підтверджено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації рослин. За її наявності частота трансформації складала 2,3%, а за відсутності – 15,6% (ген *bar*) та 20,7% (ген *nptII*). Частота трансформації за використання методу *in planta* на порядок вища, ніж при *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але можливість проведення мікроділянкових експериментів тільки впродовж часу цвітіння пшениці в природних умовах обмежує використання цього методу. До того ж на процес трансформації методом *in planta* впливають умови навколишнього середовища.

У роботі показаний вплив умов навколишнього середовища на процес трансформації пшениці. Для сорту Подолянка температурний режим  $t \approx 24$  °C і низька вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав'язування насіння ( $40,6 \pm 1,5\%$ ) та отриманню трансформантів (7,3%). При зниженні температури до 16 °C відбувається зменшення ефективності перенесення T-ДНК у рослинний геном. При підвищенні температури до 27 °C частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2%. Ймовірно, це пов'язано із блокуванням утворення *Vir*-залежних

агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК і для яких високі температурні показники є критичними.

Трансгенна природа рослин пшениці, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* підтверджена за допомогою ПЛР, ЗТ-ПЛР. Про експресію *bar* гену також свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду як в умовах *in vitro*, так і в умовах мікроділянкового дослідження. Вперше отримано рослини пшениці сортів Подолянка та Зимоярка стійкі до гербіциду фосфінотрицину (Баста®).

## ВИСНОВКИ

В результаті проведеної роботи оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *T. aestivum* для двох українських сортів Подолянка та Зимоярка *in vitro* та *in planta*; отримано рослини пшениці, стійкі до канаміцину та фосфіотрицину.

1. Встановлено, що за використання 18-добового калюсу, отриманого з апікальних меристем 3-добових проростків пшениці під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *Triticum aestivum in vitro* спостерігається найвища частота регенерації калюсу.
2. Виявлено, що на модифікованому середовищі МС, доповненому 0,5 мг/л БАП та 0,15 мг/л піклораму частота регенерації пагонів із калюсу пшениці сягає 36%.
3. Визначено оптичну щільність бактеріальної суспензії –  $OD_{600}=0,4$ , за якої відбувається ефективна агробактеріальна трансформація пшениці *in vitro*.
4. Вперше досліджено вплив  $\beta$ -лактамних антибіотиків тиметину та цефтриаксону на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої. Показано, що в культурі пшениці *in vitro* антибіотик цефтриаксон підвищує частоту регенерації пагонів на живильному середовищі, що не містить фітогормонів, до 85%.
5. Методом багатофакторного дисперсійного аналізу показано вплив чотирьох факторів (концентрації антибіотику, його типу, присутності регуляторів росту в середовищі та генотипу) на морфогенетичні процеси у пшениці: здатність до утворення морфогенних зон залежить тільки від генотипу; частота регенерації – від типу та концентрації антибіотика, а також генотипу; на частоту ризогенезу впливає тільки наявність/відсутність антибіотика у живильному середовищі.
6. Оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* двох сортів пшениці. Доведено негативний вплив сахарози на частоту трансформації рослин. За її наявності в інокуляційному

- середовищі частота трансформації складала 2,3%, а за відсутності – 15,6% (ген *bar*) та 20,7% (ген *nptII*).
7. Встановлено, що під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* температурний режим  $t \approx 24$  °C і низька вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав'язування насіння ( $40,6 \pm 1,5\%$ ) та отриманню трансформантів пшениці сорту Подолянка (7,3%).
  8. Використання канаміцину як селективного агента негативно впливає на утворення пагонів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*, в той час, як паромоміцин дозволяє отримати трансформанти сорту Подолянка (2,7%) та сорту Зимоярка (2,4%). За використання фосфінотрицину частота трансформації калюсу, одержаного з незрілих зародків пшениці сорту Зимоярка, складає 1,2%, а з калюсу апікального походження – 1,6% (сорт Зимоярка) та 1,8% (сорт Подолянка).
  9. Трансгенна природа рослин пшениці отриманих, після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* підтверджена методами ПЛР, ЗТ-ПЛР. Вперше отримано рослини пшениці сортів Подолянка та Зимоярка стійкі до гербіциду фосфінотрицину (Баста®).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Моргун В. В. Створення генетично-поліпшених ліній пшениці озимої за допомогою індукування мікромутацій / В. В. Моргун, В. П. Оксьом // Наукові доповіді НУБіП. – 2012. – Т. 24. – С. 1–18.
2. Prasad P., Djanaguiraman M. Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: sensitive stages and thresholds for temperature and duration / P. Prasad, M. Djanaguiraman // Functional Plant Biology. – 2014. – Vol. 41. – P. 1261–1269.
3. Pradhan G. P. et al. High temperature tolerance in *Aegilops* species and its potential transfer to wheat / G. P. Pradhan et al. // Crop Science. – 2012. – V. 52. – P. 292–304.
4. FAO Statistical PocketBook / [Pietro Gennari]. – Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. – 236 p.
5. U. S. Department of Agriculture U. S. Department of Agriculture [Електронний ресурс] : [www.usda.gov](http://www.usda.gov).
6. Моргун В. В. Фізіологічні основи отримання високих урожаїв пшениці / В. В. Моргун, В. В. Швартау, Д. А. Кірізії // Физиология и биохимия культурных растений. – 2008. – Т. 40. – С. 463–479.
7. Becher T. Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.) / T. Becher, G. Haberl, H. Koop // Plant Cell Rep. – 1992. – V. 11. – P. 39–43.
8. Curtis I. S. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency / I. S. Curtis, H. G. Nam // Transgenic Research. – 2001. – V. 10. – P. 363–371.
9. Feldmann K. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach / K. Feldmann // Molecular and General Genetics MGG. – 1987. – Vol. 208. – P. 1–9.
10. Lipp Joao K. H. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1Rif r: pGSFR1161 in the presence of

- acetosyringone / K. H. Joao Lipp // *Plant Cell Reports*. – 1993. – Vol.12. – P. 422–425.
11. YU Gui-rong Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Immature ymbryo Transformation System and Transformation of Glyphosate-Resistant Gene *2mG2-EPSPS* in Maize (*Zea mays* L.) // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2013. – Vol. 12. – P. 2134–2142.
  12. Zuo-yu Zhao High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize // *Molecular Breeding*. – 2001. – Vol. 8. – P. 323–333.
  13. Harwood W. A. et al. Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques // *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*. – 2009. – Vol. 478. – P. 137–147.
  14. Сахно Л. О. та ін. Створення стійких до гліфосату рослин *Brassica napus* L., які експресують десатуразу DesC ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* / Л. О. Сахно та ін. // *Biopolym. Cell*. – 2012. – Т. 28. – С. 449–455.
  15. Богульська С. В. Агробактеріальна трансформація ярого ріпаку без етапу регенерації *in vitro* / С. В. Богульська // *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. – 2014. – Вип. 82. – С. 157–163.
  16. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances / A. Ziemienowicz // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2013. – P. 1–8.
  17. Vasil V. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus / V. Vasil // *Bio/Technology*. – 1992. – Vol. 10. – P. 667–674.
  18. Graybosch R. Quality and Agronomic Effects of Three High-Molecular-Weight Glutenin Subunit Transgenic Events in Winter Wheat / R. Graybosch // *Cereal Chem*. – 2011. – Vol. 88. – P. 95–102.
  19. Šramková Z. Genetic improvement of wheat – a review / Z. Šramková // *Nova Biotechnologica*. – 2009. – Vol 9. – P. 27–51.

20. Dahleen L. S. et al. Transgenic approaches to combat fusarium head blight in wheat and barley / L. S. Dahleen et al. // Crop Sci. – 2001. – Vol. 41. – P. 628–637.
21. Gadaleta A. Stably expressed D-genome-derived HMW glutenin subunit genes transformed into different durum wheat genotypes change dough mixing properties / A. Gadaleta // Mol Breeding. – 2008. – Vol. 22. – P. 267–279.
22. Dvorak J. et al. The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat / J. Dvorak et al. // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 657–670.
23. Wicker T. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives / T. Wicker // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 1706–1718.
24. Pelayo Perez-Pineiro et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat: general overview and new approaches to model and identify the key factors involved / Perez-Pineiro Pelayo et al. // Agricultural and Biological Sciences «Transgenic Plants. – Advances and Limitations». – 2012. – P. 3–26.
25. Borlaug N. E. et al. A Green Revolution Yields a Golden Harvest / N. E. Borlaug et al. // Columbia Journal of World Business. – 1969. – Vol. 4. – P. 9–19.
26. Hedden P. The genes of the Green Revolution / P. Hedden // Trends in Genetics. – 2003. – Vol. 19. – P. 5–9.
27. Jauhar P. Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges / P. Jauhar // Crop science. – 2006. – Vol. 46. – P. 1841–1859.
28. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – К. : «Наукова думка», 1997. – 152 с.

29. Hain R. Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts – Direct gene transfer from microorganism to higher plant / R. Hain, H. Steinbiß, J. Schell // *Plant Cell Rep.* – 1984. – Vol. 3. – P. 60–64.
30. Block M. et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny / Marc De Block et al. // *The EMBO Journal.* – 1984. – Vol. 3. – P. 1681–1689.
31. Baba A. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts / A. Baba, S. Hasezawa, K. Syōno // *Plant Cell Physiol.* – 1986. – Vol. 27. – P. 463–471.
32. Horsch R. B. et al. A simple and general method for transferring genes into plants / R. B. Horsch et al. // *Science.* – 1985. – Vol. 227. – P. 1229–1231.
33. Ding L. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat / L. Ding // *Mol Biol Rep.* – 2009. – Vol. 36. – P. 29–36.
34. Cheng M. et al. Invited Review: Factors Influencing *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Monocotyledonous Species / M. Cheng et al. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* – 2004. – Vol. 40. – P. 31–45.
35. Nadolska-Orczk A. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals – from technique development to its application / A. Nadolska-Orczk et al. // *Acta physiologiae plantarum.* – 2000. – Vol. 22. – P. 77–88.
36. Sharma V. K. et al. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments / V. K. Sharma et al. // *Plant Breed.* – 2005. – Vol. 124. – P. 242–246.
37. Repellin A. et al. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: New challenges / A. Repellin et al. // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2001. – Vol. 64. – P. 159–183.

38. Cuthbert P. A. et al. Fine mapping Fhb1, a major gene controlling *Fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / P. A. Cuthbert et al. // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 112. – P. 1465–1472.
39. Chen X. et al. Saturation and comparative mapping of a major *Fusarium* head blight resistance QTL in tetraploid wheat / X. Chen et al. // Mol. Breed. – 2007. – Vol. 9. – P. 113–124.
40. Benderradji L. et al. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions / L. Benderradji et al. // Int. Schol. Res. Network. – 2012. – P. 1–8.
41. Dodds John H. Experiments in Plant Tissue Culture / John H. Dodds, Lorin Watson Roberts. – International Potato Center. – 1985. – P. 232.
42. Terzi M. Somatic Cell Genetics of Plants / M. Terzi, R. Sung, J. Widholm // Critical Reviews in Biotechnology. – 1985. – Vol. 3. – P. 303–330.
43. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1964. – 272 с.
44. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 259 с.
45. La Rue CD Cultures on the endosperm of maize // AM. J. Botany. – 1949. – Vol. 34. – P. 585–586.
46. Gamborg O. L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O. L. Gamborg, D. E. Eveleigh // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46 – P. 417–421.
47. Shimada T. *In vitro* culture of wheat tissues. I. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture / T. Shimada, T. Sasakuma, K. Tsunewaki // Canadian Journal of Genetics and Cytology. – 1969. – Vol. 11. – P. 294–304.
48. Bahman Fazeli-nasab et al. Callus induction and plant regeneration of wheat mature embryos under Abscisic Acid treatment / Fazeli-nasab Bahman et al.

- // International Journal of Agriculture and Crops Sciences. – 2012. – Vol. 4. – P. 17–23.
49. Ozgen M. et al. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes / M. Ozgen et al. // Plant Breeding. – 1996. – Vol. 115. – P. 455–458.
50. Бавол А. В. Дослідження впливу тидіазурону на частоту утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у культурі *in vitro* м'якої пшениці / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько, М. О. Зінченко // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – Т. 9. – С. 129–133.
51. Khatun M. R. Effect of callus induction media and phytohormones on regeneration of shoots in spring wheat / M. R. Khatun // J. Agrofor. Environ. – 2013. – Vol. 7. – P. 93–96.
52. Maksimov I. V. et al. The Effect of Exogenous Phytohormones on Resistance of Wheat Calluses to *Tilletia caries* (D.C.) Tul. & C. Tul / I. V. Maksimov et al. // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – Vol. 5. – P. 1745–1754.
53. Holubenko A. V. Studies of morphogenesis *Gentiana macrophylla* Pall. In sterile culture conditions / A. V. Holubenko // Vydavnychiy tsentr «Kyivskyi universytet», Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu «Introduktsiia ta zberezhennia roslynnoho riznomanittia». – 2004. – V. 7. – P. 52–53.
54. Coenen C. The Diageotropica Gene Differentially Affects Auxin and Cytokinin Responses throughout Development in Tomato / C. Coenen, T. Lomax // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 117. – P. 63–72.
55. Kruglova N. N. Biotechnological evaluation of explants for obtaining regenerated *in vitro* plants of spring wheat in order adaptive selection in the conditions of the Southern / N. N. Kruglova, O. A. Seldimirova, D. Y. Zaitsev, A. A. Katasonova. – Urals. Izv. Chelyab. NC UrO RAN – 2006 – Vol. 2. P. – 94–98. (In Russian).

56. Круглова Н. Н. Морфогенез андроклинных каллюсов злаков *in vitro* / Н. Н. Круглова, О. В. Дубровная // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – Т. 43. – С. 15–25.
57. Gopitha K. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane / K. Gopitha, A. Bhavani Lakshmi, J. Senthilmanickam // Int. J. Pharma Bio Sci. – 2010. – Vol. 1. – P. 1–7.
58. Ying-Hua Su. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development / Ying-Hua Su, Yu-Bo Liu, Xian-Sheng Zhang. – Mol. Plant. – 2011. – Vol. 4. – P. 616–625.
59. Kachhwaha S. Somatic embryo genesis and long term high plant regeneration from barley (*Hordeum vulgare* L.) using picloram / S. Kachhwaha, A. Varshney, S. Kothari // Cereal Res. Comm. – 1997. – Vol. 25. – P. 117–126.
60. Castillo A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grow in Spain / A. Castillo, B. Egana, J. Sanz, L. Cistuo // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17. – P. 902–906.
61. Kotchoni S. O. et al. A simple and efficient seed-based approach to induce callus production from B73 maize genotype / S. O. Kotchoni et al. // American Journal of Molecular Biology. – 2012. – Vol. 2. – P. 380–385.
62. Morel G. M. Tissue culture of monocotyledons / G. M. Morel, R. H. Wetmore // American Journal of Botany. – 1951. – Vol. 38. – P. 138–140.
63. Benkirane H. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat / H. Benkirane et al. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – Vol. 61. – P. 107–113.
64. Ahmad A. et al. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Ahmad et al. // In Vitro Cellular and Developmental Biology. – 2002. – Vol. 38. – P. 163–167.

65. Arzani A. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress / A. Arzani, S-S. Mirodjagh // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1999. – Vol. 58. – P. 67–72.
66. Przetakiewicz A. et al. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale / A. Przetakiewicz et al. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – Vol. 73. – P. 245–256.
67. Souza Canada E. D. Embryogenic callus induction on the scutellum and regeneration of plants as basis for genetic transformation of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Argentina / E. D. Souza Canada, E. Beck // Journal of Basic & Applied Genetics. – 2013. – Vol. 24. – P. 55–66.
68. Журавлёв Н. Ю. Морфогенез у растений *in vitro* / Н. Ю. Журавлёв, М. А. Омелько // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – С. 643–664.
69. Тихомирова Л. И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* / Л. И. Тихомирова // Turczaninowia. – 2010. – Т. 13. – P. 147–151.
70. Delporte F. et al. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat / F. Delporte et al. // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – P. 1455–1470.
71. Сельдимирова О. А. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы / О. А. Сельдимирова, А. А. Катасонова, Н. Н. Круглова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т. 43. – С. 297–306.
72. Elhiti M. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview / M. Elhiti, C. Stasolla // Plant embryo culture. – 2011. – Vol. 710. – P. 229–255.
73. Chen Jun-Ying et al. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture / Chen Jun-Ying et al. // Agricult. Sci. China. – 2006. – Vol. 5. – P. 572–578.

74. Varshney A. Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum iw.uivum* L.) / A. Varshney, F. Altpeter // Mol. Breed. – 2001. – Vol. 8. – P. 295–309.
75. Skoog F. Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Cultures / F. Skoog // American Journal of Botany. – 1944. – Vol. 31. – P. 19–24.
76. Xueyan S. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley / S. Xueyan, L. Desen, Q. Rongda // In vitro Cellular and Development Biology. – 2000. – Vol. 36. – P. 207–210.
77. Nonda R. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia Arabica* / R. Nonda, G. Rout // Plant Cell Tissue and Organ Cultures. – 2003. – Vol. 73. – P. 131–135.
78. Gresshoff P. M. Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured *in vitro* / P. M. Gresshoff // Phytohormones and related compounds. – 1978. – Vol. 2. – P. 1–29.
79. Носов А. М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А. М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 837–844.
80. Barro F. et al. Medium optimisation for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum / F. Barro et al. // Euphytica. – 1999. – Vol. 108. – P. 161–167.
81. Keresa S. et al. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) / S. Keresa et al. // Die Bodenkultur. – 2003. – Vol. 54. – P. 155–161.
82. Konieczny R. et al. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture / R. Konieczny et al. // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. – 2003. – Vol. 73. – P. 177–187.

83. Eudes F. et al. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants / F. Eudes et al. // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2003. – Vol. 73. – P. 147–157.
84. Troshina N. B. et al. Plant Resistance Inductors and Active Forms of Oxygen. The Influence of Salicylic Acid on Production of Hydrogen Peroxide in the Common Cultures of Wheat Callus and Bunt Pathogen / N. B. Troshina et al. // *Cytology.* – 2004. – Vol. 46. – P. 1001–1005.
85. Maksimov I. V. et al. Changes in the Phytohormone Levels in Wheat Calli as Affected by Salicylic Acid and Infection with *Tilletia caries*, a Bunt Pathogenic Agent / I. V. Maksimov et al. // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2004. – Vol. 51. – P. 228–233.
86. Torrey J. G. The initiation of organized development in plants / J. G. Torrey // *Adv. Morphogenesis.* – 1966. – Vol. 5. – P. 39–91.
87. Saenz L. et al. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants / L. Saenz et al. // *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2006. – Vol. 42. – P. 19–25.
88. Motoike S. Y. et al. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree) / S. Y. Motoike et al. // *Ibid.* – 2007. – Vol. 89. – P. 75–81.
89. Косулина Л. Г. Особенности процесса регенерации в каллюсной культуре зрелых зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Л. Г. Косулина // *С.-х. биология. Сер. Биология растений.* – 1995. – Т. 5. – С. 78–84.
90. Peixe A. et al. Induction of haploid morphogenic calluses from *in vitro* cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv. Harcot / A. Peixe et al. // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* – 2004. – Vol. 77. – P. 35–41.
91. Steinmacher D. A. et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation / D. A. Steinmacher et al. // *Ann. Bot.* – 2007. – Vol. 100. – P. 699–709.

92. Круглова Н. Н. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат / Н. Н. Круглова, А. А. Катасонова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41. – С. 124–131.
93. Meins F. Heritable variation in plant cell culture / F. Meins // Annu. Rev. Plant Physiol. – 1983. – Vol. 34. – P. 327–346.
94. Hu T. et al. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection / T. Hu et al. // Plant Cell Reports. – 2003. – Vol. 21. – P. 1010–1019.
95. Tahir M. Genetic transformation protocols using zygotic embryos as explants: an overview / M. Tahir, E. Waraich, C. Stasolla // Plant embryo culture. – 2011. – Vol. 710. – P. 309–326.
96. Ozias-Akins P. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): evidence for somatic embryogenesis / P. Ozias-Akins, I. Vasil // Protoplasma. – 1982. – Vol. 10. – P. 95–105.
97. Zamora A. B. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves / A. B. Zamora, K. J. Scott // Plant Sci. Lett. – 1983. – Vol. 29. – P. 183–189.
98. Supartana P. et al. Development of simple and efficient in Planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* / P. Supartana et al. // Journal of Bioscience Bioengineering. – 2006. – Vol. 102. – P. 162–170.
99. Özgen M. et al. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes / M. Özgen et al. // Plant Breed. – 1996. – Vol. 115. – P. 455–458.
100. Parrott D. L. *Agrobacterium* induces plant cell death in wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. L. Parrott, A. J. Anderson, J. G. Carman // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2002. – Vol. 60. – P. 59–69.
101. Shrawat A. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers / A. Shrawat, L. Horst // Journal of Plant Biotechnology. – 2006. – Vol. 4. – P. 575–603.

102. TAO Li-li et al. Improvement of Plant Regeneration from Immature Embryos of Wheat Infected by *Agrobacterium tumefaciens* / Li-li TAO et al. // Agricultural Sciences in China. – 2011. – Vol. 10. – P. 317–326.
103. Enríquez-Obregün G. A. et al. *Agrobacterium*-mediated japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment / G. A. Enríquez-Obregün et al. // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1999. – Vol. 59. – P.159–168.
104. Xia L. et al. GM wheat development in China: current status and challenges to commercialization / L. Xia et al. // J Exp Bot. – 2012. – Vol. 63. – P. 1785–1790.
105. Yang Y. Genomic resources for functional analyses of the rice genome / Y. Yang, Y. Li, C. Wu // Curr Opin Plant Biol. – 2013. – Vol. 16. – P. 157–163.
106. Yang B. et al. Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem / B. Yang et al. // Molecular Plant Breeding. – 2008. – Vol. 6. – P. 358–362.
107. Zhou M.D. Selectivity of auxin for induction and growth of callus excised embryo of spring and winter wheat / M. D. Zhou, T. T. Lee // Can J Bot. – 1984. – Vol. 62. – P. 1393–1397.
108. Parmar S. et al. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars / S. Parmar et al. // Physiol Mol Biol Plants. – 2012. – Vol. 18. – P. 177–183.
109. Manoj-Kumar Arthikala et al. Utility of a tissue culture-independent *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation strategy in bell pepper to develop fungal disease resistant plants / Arthikala Manoj-Kumar et al. // Scientia Horticulturae. – 2014. – Vol. 170. – P. 61–69.
110. Sticklen M. B. Invited review: Shoot apical meristem: A sustainable explant for genetic transformation of cereal crops / M. B. Sticklen, H.

- F. Oraby // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2005. – Vol. 41. – P. 187–200.
111. Дубровна О. В. Біотехнологія пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія : [монографія] / О. В. Дубровна, Б. В. Моргун, А. В. Бавол. – К. : Логос, 2014. – 375 с.
112. Гончарук О. М. Морфогенез в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці / О. М. Гончарук, А. В. Бавол, О. В. Дубровна // *Физиология растений и генетика.* – 2014. – Т. 46. – С. 245–251.
113. Bommineni V. R. Reorganization of cells in the maize apical dome within six days of culture after microsurgery / V. R. Bommineni, P. C. Cheng, D. B. Walden // *Maydica.* – 1995. – Vol. 40. – P. 289–298.
114. Lyndon F. L. Shoot apical meristem: its growth and development / F. L. Lyndon // Cambridge : Cambridge University Press. – 1998. – 277 p.
115. Bowman J. Formation and maintenance of the shoot apical meristem / J. Bowman, Y. Eshed // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol. 5. – P. 110–115.
116. Chandra A. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: an overview / A. Chandra, D. Pental // *Curr. Sci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 381–387.
117. Zhang S. Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.) / S. Zhang // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – Vol. 92. – P. 752–761.
118. Bidney D. et al. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens* / D. Bidney et al. // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 18. – P. 301–313.
119. Brar G. S. et al. Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELLw technology / G. S. Brar et al. // *Plant J.* – 1994. – Vol. 5. – P. 745–753.

120. Becker D. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue / D. Becker, R. Brettschneider, H. Lorz // *Plant J.* – 1994. – Vol. 5. – P. 299–307.
121. Kloti A. et al. Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos / A. Kloti et al. // *Plant Cell Rep.* – 1993. – Vol. 12. – P. 671–675.
122. Guo G. Q. Transgenic plants obtained from wheat protoplasts transformed by PEG-mediated direct gene transfer / G. Q. Guo // *Chin Sci Bull.* – 1993. – Vol. 13. – P. 1227–1231.
123. Dai S. H. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment / S. H. Dai // *Mol Breed.* – 2001. – Vol. 7. – P. 25–33.
124. Douglas C. J. et al. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region / C. J. Douglas et al. // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 161. – P. 850–860.
125. Ziemienowicz A. Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA / A. Ziemienowicz // *Acta Biochim. Pol.* – 2001. – Vol. 48. – P. 623–635.
126. Gelvin S. B. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's Journey to the Host Genome / S. B. Gelvin // *Front Plant Sci.* – 2012. – Vol. 3. – P. 52.
127. Ziemienowicz A. Mechanisms of T-DNA integration. In: *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology* / A. Ziemienowicz, T. Tzfira, B. Hohn // Springer, New York. – 2008. – P. 396–441.
128. Ishida Y. et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Ishida et al. // *Nat Biotechnol.* – 1996. – Vol. 14. – P. 745–750.
129. Hiei Y. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Hiei, Y. Ishida, T. Komari // *Frontiers in Plant Science.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–11.

130. Sparks C. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery / C. Sparks, A. Doherty, H. Jones // *Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1099. – P. 235–250.
131. Hensel G. et al. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize / G. Hensel et al. // *International Journal of Plant Genomics.* – 2009. – P. 1–9.
132. Sood P. Problems and possibilities of monocot transformation / P. Sood, A. Bhattacharya, A. Sood // *Biol Plant.* – 2011. – Vol. 55. – P. 1–15.
133. Guo M. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tomtomatoes / M. Guo // *Gen. Mol. Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 661–671.
134. Gelvin S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration / S. B. Gelvin // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 51. – P. 223–256.
135. Karthikeyan A. *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf base derived callus tissues of popular indica rice (*Oryza sativa* L. sub sp. indica cv. ADT 43) / A. Karthikeyan, S. Pandian, M. Ramesh // *Plant Science.* – 2011. – Vol. 181. – P. 258–268.
136. Jones H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat / H. Jones, A. Doherty, H. Wu // *Plant Methods.* – 2005. – Vol. 1. – P. 1–15.
137. Sundaresha S. *Agrobacterium tumefaciens* – genetics to gene transfer / S. Sundaresha // *Current Biotica.* – 2009. – Vol. 2. – P. 507–535.
138. Ahmed Dokumbo E. *Agrobacterium* change: A help to farming biotechnology / Ahmed Dokumbo E., Damfolio Housman I., Ahmed Zubaru // *International Journal of Genetics and Genomics.* – 2015. – Vol. 2. – P. 109–112.

139. Cheng M. et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / M. Cheng et al. // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 971–980.
140. Khanna H. K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium / H. K. Khanna, G. E Daggard // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21. – P. 429–436.
141. Komari T. et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers / T. Komari et al. // Plant J. – 1996. – Vol. 10. – P. 165–174.
142. Bińka A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*x Triticosecale Wittmack*): role of the binary vector system and selection cassettes / A. Bińka, W. Orczyk, A. Nadolska-Orczyk // J Appl Genetics. – 2012. – Vol. 53. – P. 1–8.
143. Manickavasagam M. et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (saccharum species hybrids) using axillary buds / M. Manickavasagam et al. // Plant cell Reports. – 2004. – Vol. 23. – P. 134–143.
144. Opabode J. T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency / J. T. Opabode // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2006. – Vol. 1. – P. 12–20.
145. Sarker R. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated of wheat (*Triticum aestivum* L.) / R. Sarker, K. Islam, M. Hoque // Plant Tiss Cult. – 2009. – Vol. 12. – P. 155–165.
146. Rashid H. et al. Effect of bacterial culture density and Acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat / H. Rashid et al. // Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42. – P. 4183–4189.

147. Amoah B. K. et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue / B. K. Amoah et al. // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 52. – P. 1135–1142.
148. Ke Xia-Yi et al. Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by *Agrobacterium* into cells of immature embryos of barley and wheat / Xia-Yi Ke et al. // J. Euphytica. – 2002. – Vol. 126. – P. 333–343.
149. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
150. Olhoft P. M. et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells / P. M. Olhoft et al. // Plant Cell Rep. – 2001. – Vol. 20. – P. 731–737.
151. Cheng M. et al. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat / M. Cheng et al. // In Vitro Cell Dev Biol Plant. – 2003. – Vol. 39. – P. 595–604.
152. Wang X. H. et al. Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated glyphosateresistant gene (EPSPS) transformation and correlation factor in maize / X. H. Wang et al. // Journal of Shanxi Agricultural Sciences. – 2010. – Vol. 38. – P. 11–14.
153. Boyko A. Potassium chloride and rare earth elements improve plant growth and increase the frequency of the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation / A. Boyko, A. Matsuoka, I. Kovalchuk // Plant Cell Rep. – 2011. – Vol. 30. – P. 505–518.
154. Huang Y. H. et al. Study on the development of transgenic wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. H. Huang et al. // Acta Agronomica Sinica. – 2002. – Vol. 28. – P. 510–515.

155. Howe A. et al. Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum / A. Howe et al. // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 25. – P. 784–791.
156. Lin J. J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells / J. Lin, N. Assad-Garcia, J. Kuo. – Plant Sci. – 1995. – Vol. 109. – P. 171–177.
157. Ribas A. F. et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures / A. F. Ribas et al. // BMC Plant Biol. – 2011. – Vol. 11. – P. 92–107.
158. Su G. et al. Low co-cultivation temperature at 20 °C resulted in the reproducible maximum increase in both the fresh weight yield and stable expression of GUS activity after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco leaf disks / G. Su et al. // Am. J. Plant Sci. – 2012. – Vol. 3. – P. 537–545.
159. Rout J. R. et al. *Agrobacterium*-mediated stable genetic transformation of suspension cells of corn (*Zea mays* L.) / J. R. Rout et al. // 38th Annual maize genetics conf. St Charles. – 1996. – P. 4–17.
160. Kondo T. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer / T. Kondo, H. Hasegawa, M. Suzuki // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 1. – P. 989–993.
161. Salas M. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells / M. Salas, S. Park, M. Srivatanakul, R. Smith // Plant Cell Rep. – 2001. – Vol. 20. – P. 701–705.
162. He Y. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency / Y. He et al. // Journal of Experimental Botany. – 2010. – Vol. 61. – P. 1567–1581.

163. Langridge P. et al. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment / P. Langridge et al. // *Plant J.* – 1992. – Vol. 2. – P. 631–638.
164. Wu H. et al. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat / H. Wu et al. // *Plant Cell Reports.* – 2003. – Vol. 21. – P. 659–668.
165. Rekha S. Effect of desiccation of maize calli on the efficiency of transformation prior and post to infection by *Agrobacterium tumefaciens* / S. Rekha, T. Sekhar, P. Veeru // *International Research Journal of Biological Sciences.* – 2014. – Vol. 3. – P. 59–62.
166. Daniell H. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants / H. Daniell, S. Streatfield, K. Wycoff // *Trends Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6. – P. 219–226.
167. Song W. Y. et al. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants / W. Y. Song et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 914–919.
168. Ellis D. R. et al. Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase / D. R. Ellis et al // *BMC Plant Biol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1–11.
169. Weir B. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker / B. Weir et al. // *Aust J Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 28. – P. – 807–818.
170. Patnaik D. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum* / D. Patnaik, D. Vishnudasan, P. Khurna // *Curr. Sci.* – 2006. – Vol. 91. – P. 307–317.
171. Manfroi E. et al. Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes

- by *Agrobacterium tumefaciens* / E. Manfroi et al. // Genet. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 38. – P. 470–476.
172. Hess D. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. Hess, K. Dressler, R. Nimmrichter. – Plant Sci. – 1990. – Vol. 72. – P. 233–244.
173. Xue Z. Y. et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup> / Z. Y. Xue et al. // Plant Science. – 2004. – Vol. 167. – P. 849–859.
174. Bi R. M. et al. Production and analysis of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene / R. M. Bi et al. // Euphytica. – 2006. – Vol. 151. – P. 351–360.
175. Agarwal S. et al. Floral transformation of wheat / S. Agarwal et al. // Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats. – 2009. – Vol. 478. – P. 105–113.
176. Dan Y. et al. Lipoic acid: a unique plant transformation enhancer / Y. Dan et al. // Vitro Cell and Developmental Biology–Plant. – 2009. – Vol. 45. – P. 630–638.
177. Zale J. M. et al. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* / J. M. Zale et al. // Plant Cell Reports. – 2009. – Vol. 28. – P. 903–913.
178. Moghaieb R. E. et al. Genetic transformation of mature embryos of bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat genotypes / R. E. Moghaieb et al. // GM Crops. – 2010. – Vol. 1. – P. 87–93.
179. Shaw D. J. Visualisation of stromules in transgenic wheat expressing a plastid-targeted yellow fluorescent protein / D. J. Shaw, J. C. Gray // Planta. – 2011. – Vol. 233. – P. 961–970.
180. Chugh A. et al. A Novel approach for *Agrobacterium*-mediated germ line transformation of Indian Bread wheat (*Triticum aestivum*) and Pasta wheat

- (*Triticum durum*) / A. Chugh et al. // Journal of Phytology. – 2012. – Vol. 4. – P. 22–29.
181. Han J. et al. Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* / J. Han et al. // BMC Plant Biology. – 2012. – Vol. 12. – P. 1–9.
182. Sawahel W. A. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline / W. A. Sawahel, A. H. Hassan // Biotechnology Letters. – 2002. – Vol. 24. – P. 721–725.
183. Razzaq A. et al. Development of *in planta* transformation protocol for wheat / A. Razzaq et al. // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10. – P. 740–750.
184. Subramanyam K. et al. Assessment of factors influencing the *Agrobacterium*-mediated *in planta* seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.) / K. Subramanyam et al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2013. – Vol. 171. – P. 450–68.
185. Чумаков М. И. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* / М. И. Чумаков, Е. М. Моисеева // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 8–20.
186. Jaganath B. et al. An efficient *in planta* transformation of *Jatropha curcus* (L.) and multiplication of transformed plants through *in vivo* grafting / B. Jaganath et al. // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – P. 591–601.
187. Supartana P. et al. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* / P. Supartana et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – Vol. 100. – P. 391–397.
188. Katavic V. et al. *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana* / V. Katavic et al. // Mol. Gen. Genet. – 1994. – Vol. 245. – P. 363–370.
189. Clough S. J. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S. J. Clough, A. F. Bent // Plant J. – 1998. – Vol. 16. – P. 735–743.

190. Yasmeeen A. et al. *In planta* transformation of tomato / A. Yasmeeen et al. // Plant Mol. Biol Report. – 2009. – Vol. 27. – P. 20–28.
191. Kumar A. M. et al. Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annuum* L.): transgenics (uid A::hptII) by a tissue culture independent *Agrobacterium*-mediated *in planta* approach / A. M. Kumar et al. // Scientia Horticulturae. – 2009. – Vol. 119. – P. 362–370.
192. Chumakov M. I. et al. *Agrobacterium* mediated *in planta* transformation of maize via pistil filaments / M. I. Chumakov et al. // Russian J. Genet. – 2006. – Vol. 42. – P. 893–97.
193. Mamontova E. M. et al. *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of maize germ cells / E. M. Mamontova et al. // Russian Journal of Genetics. – 2010. – Vol. 46. – P. 501–504.
194. Moiseeva Y. M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method / Y. M. Moiseeva et al. // British Biotechnology Journal. – 2014. – Vol. 4. – P. 116–125.
195. Mu G. et al. Genetic Transformation of Maize Female Inflorescence Following Floral Dip Method Mediated by *Agrobacterium* / G. Mu et al. // Biotechnology. – 2012. – Vol. 11. – P. 178–183.
196. Bechtold N. et al. The maternal chromosome set is the target of T-DNA *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana* / N. Bechtold et al. // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 1875–1887.
197. Bechtold N. *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration / N. Bechtold, G. Pelletier // Meth. Mol. Biol. – 1998. – V. 82. – P. 259–266.
198. Desfeux C. Female reproductive tissue sare the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method / C. Desfeux, S. Clough, A. Bent // Plant Physiol. – 2000. – Vol. 123. – P. 859–904.

199. Feldmann K. A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum / K. A. Feldmann // *The Plant Journal*. – 1991. – Vol. 1. – P. 71–82.
200. Li J. et al. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets / J. Li et al. // *International Journal of Biology*. – 2010. – Vol. 2. – P. 127–131.
201. Rod-in W. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation / W. Rod-in, K. Sujipuli, K. Ratanasut // *Journal of Agricultural Technology*. – 2014. – Vol. 10. – P. 467–474.
202. Narusaka M. et al. The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping / M. Narusaka et al. // *Plant Biotechnology*. – 2010. – Vol. 27. – P. 349–351.
203. Tempe J. et al. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall / J. Tempe et al. // *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*. – 1977. – Vol. 74. – P. 2848–2849.
204. Alt-Moerbe J. et al. Temperature-sensitive step in Ti plasmidvir-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria* / J. Alt-Moerbe et al. // *Molecular and General Genetics*. – 1988. – Vol. 213. – P. 1–8.
205. Fullner K. J. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* / K. J. Fullner, E. W. Nester // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 1498–1504.
206. Dillen W. et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants / W. Dillen et al. // *The Plant Journal*. – 1997. – Vol. 12. – P. 1459–1463.
207. Turk S. C. et al. Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains Role of the VirA sensor protein / S. C. Turk et al. // *Plant Mol Biol*. – 1991. – Vol. 16. – P. 1051–1059.

208. Воронова С. С. Генетична трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням штаму AGLO, який містить pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази / С. С. Воронова, А. В. Бавол, О. В. Дубровна // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 15. – С. 126–130.
209. Trieu A. T. et al. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* / A. T. [Trieu](#) et al. // Plant J. – 2000. – Vol. 22. – P. 531–541.
210. Викторэк-Смагур А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация / А. Викторэк-Смагур, К. Хнатушко-Конка, А. Кононович // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 619–628.
211. Keshamma E. et al. Tissue culture-independent *In Planta* Transformation strategy: an *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated gene Transfer Method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / E. Keshamma et al. // The Journal of Cotton Science. – 2008. – Vol. 12. – P. 264–272.
212. Гончарук О. М. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів / О. М. Гончарук, А. В. Бавол, О. В. Дубровна // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць. – 2011. – Т. 11. – С. 237–241.
213. Бавол А. В. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, І. І. Лялько // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5. – С. 3–10.
214. Бавол А. В. Вплив тидіазурону на процеси морфогенезу в культурі *in vitro* м'якої пшениці / А. В. Бавол // Физиология и биохимия культур растений. – 2011. – Т. 43. – С. 412–418.
215. Christensen A. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in

- monocotyledonous plants / A. H. Christensen, P. H. Quail // *Transgenic Research*. – 1996. – Vol. 5. – P. 213–218.
216. Щербак Н. Л. Вивчення LOX-опосередкованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Щербак Наталія Леонідівна. – Київ, 2015. – 25 с.
217. Holasova M. et al. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. human and the food chain isolates / M. Holasova, R. Karpiskova, S. Karpiskova, V. Babak, J. Schlegelova // *Veterinari Medicina*. – 2007. – Vol. 52 – P. 169–174.
218. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // *Clin Microbiol Infect*. – 1998. – Vol. 4. – P. 291–296.
219. Priya A. et al. The effect of different antibiotics on the elimination of *Agrobacterium* and high frequency *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) / A. Priya et al. // *Genet. Plant Breed*. – 2012. – Vol. 48. – P. 120–130.
220. Горбатюк І. Р. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка / І. Р. Горбатюк, І. С. Гнатюк, М. О. Банникова, А. М. Тараненко, Б. В. Моргун // *Физиология растений и генетика*. – 2015. – Т. 47 – С. 514–525.
221. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М. : Изд-во иностранной литературы, 1954. – 718 с.
222. Паушева З. Практикум по цитологии растений / З. Паушева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
223. Poorter H. Plant growth analysis: an evaluation of experimental design and computational methods / H. Poorter, E. Gamier // *Journal of Experimental Botany*. – 1996. – Vol. 47. – P. 1343–1351.

224. Philipson Ch. D. et al. Light-based Regeneration Niches: Evidence from 21 Dipterocarp Species using Size-specific RGRs / Ch. D. Philipson et al. // BIOTROPICA. – 2012. – Vol. 44. – P. 627–636.
225. Sidorov V. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus / V. Sidorov, D. Duncan // Methods Mol Biol. – 2009. – Vol. 526. – P. 47–58.
226. Demeke T. et al. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat / T. Demeke et al. // Ther. and Appl. Genet. – 1999. – Vol. 99. – P. 947–953.
227. Sawada H. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains / H. Sawada, H. Leki, I. Matsuda // Applied and environmental microbiology. – 1995. – Vol. 61. – P. 828–831.
228. Kim Y.-Y. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast / Y.-Y. Kim et al. // J. of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. – P. 15893–15902.
229. Sestili F. et al. Research article Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes / F. Sestili et al. // BMC Plant Biology. – 2010. – Vol. 10. – P. 1–12.
230. Sokal R. R. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research / R. R. Sokal, J. F. Rohlf // W. H. Freeman and Company, San Francisco. – 2nd ed., 1981. – 859 p.
231. Fisher R. A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance / R. A. Fisher // Philosophical Transactions Royal Society Edinburgh. – 1918. – Vol. 52. – P. 399–433.
232. Ihaka R. A language for data analysis and graphics / R. Ihaka, R. Gentleman // J. Computational Graphical Statistics. – 1996 – Vol. 5. – P. 299–314.

233. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances / A. Ziemienowicz // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2014. – Vol. 3. – P. 95–102.
234. Si-Nae Han et al. Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo / Han Si-Nae et al. // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2007. – Vol. 10. – P. 92–98.
235. Haddadi F. et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry cv. Camarosa by a dual plasmid system / F. Haddadi et al. // Molecules. – 2015. – Vol. 20. – P. 3647–3666.
236. Reddy S. H. et al. Influence of Bavistin and Silver Thiosulphate on *in vitro* regeneration of *Asclepias curassavica* (L.) using nodal explants / S. H. Reddy et al. // American Journal of Plant Sciences. – 2012. – Vol. 3. – P. 941–946.
237. Grzebelus E. Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures / E. Grzebelus, L. Skop // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 2014. – Vol. 50. – P. 568–575.
238. Tang H. et al. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut of somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants / H. Tang et al. // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 881–887.
239. Farzaneh A. et al. Determine effective concentrations of  $\beta$ -lactam antibiotics against three strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phytotoxicity on Tomato and Tobacco / A. Farzaneh et al. // International Journal of Agronomy and Plant Production. – 2013. – Vol. 4. – P. 2919–2925.
240. Demain A. The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future / A. Demain, R. Elander // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 75. – P. 5–19.

241. Tran T. N. Effect of antibiotics on callus regeneration using transformation of IR64 rice / T. N. Tran, N. Sanan-Mishra // *Biotechnology Reports*. – 2015. – Vol. 7. – P. 143–149.
242. Asbel L. E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams / L. E. Asbel, M. E. Levison // *Infect. Dis. Clin. North Am.* – 2000. – Vol. 14. – P. 435–447.
243. Yarizadea A. Evaluation of effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on suppression of different strains of *Agrobacterium tumefaciens* and on wheat mature embryo culture / A. Yarizadea, F. Arama, A. Niazia, Y. Ghasemib // *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 8. – P. 267–276.
244. Nauerby B. et al. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to Carbenicillin and Cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* / B. Nauerby et al. // *Plant Science*. – 1997. – Vol. 123. – P. 169–177.
245. Panathula Ch. et al. The stimulatory effects of the antimicrobial agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important anti-jaundice medicinal plant / Ch. Panathula et al. // *American Journal of Plant Sciences*. – 2014. – Vol. 5. – P. 279–285.
246. Danilova S. The stimulatory effect of the antibiotic Cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture / S. Danilova, Y. Dolgikh // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 51. – P. 559–562.
247. Borrelli G. et al. Effect of Cefotaxime on callus culture and plant regeneration in durum wheat / G. Borrelli et al. // *Journal of Plant Physiology*. – 1992. – Vol. 140. – P. 372–374.
248. Дубровна О. В. Вплив цефотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці / О. В. Дубровна, А. В. Бавол, М. О. Зінченко, О. М. Гончарук, І. І. Лялько // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2012. – Т. 44. – С. 218–224.

249. James D. et al. Genetic transformation of Apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector / D. James et al. // Plant Cell Reports. – 1989. – Vol. 7. – P. 658–661.
250. Mamidala P. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato / P. Mamidala, R. Nanna // Plant Omics Journalю. – 2009. – Vol. 2. – P. 135–140.
251. Kazemi E. et al. Reduction of negative effects of Cefotaxime in tomato transformation by using FeEDDHA / E. Kazemi et al. // International Journal of Farming and Allied Sciences. – 2014. – Vol. 3. – P. 538–542.
252. Mendes A. F. et al. Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison / A. F. Mendes et al. // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2009. – Vol. 97. – P. 331–336.
253. Costa M. G. C. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars / M. G. C. Costa // Plant Cell Report. – 2000. – Vol. 19. – P. 327-332.
254. Cheng Z-M et al. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation / Z-M Cheng et al. // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17. – P. 646–649.
255. Gorbatyuk I. R. Effect of antibiotic ceftriaxone on elimination of *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of *Triticum aestivum in vitro* / I. R. Gorbatyuk, I. S. Gnatyuk, M. O. Bannikova, B. V. Morgun // Conference of Young Scientists, 2015, September 21-25. – Kyiv. – P. 107.
256. Elsayed M. Effect of ceftriaxone on isolated gastrointestinal, tracheal and uterine smooth muscles / M. Elsayed, A. Elkomy, H. Aboubakr // Int J Pharm Sci Res. – 2011. – Vol. 2. – P. 2347–2351.
257. Raghunath M. Formulation and evaluation of a fixed dose combination of ceftriaxone disodium and ornidazole / M. Raghunath, S. Bakal // Int J Pharm Life Sci. – 2013. – Vol. 5. – P. 750–756.
258. Bhamidimarri K. Drug-Induced Cholestasis / K. Bhamidimarri, S. Eugene // Clin Liver Dis. – 2013. – Vol. 17. – P. 519–531.

259. Tratselas A. et al. Effect of Ceftriaxone on the Outcome of Murine Pyelonephritis Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* / A. Tratselas et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – P. 7102–7111.
260. Hong Ying Duan et al. Plant Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Achyranthes bidentata* using cotton EREBP gene / Ying Duan Hong et al. // *Biology and Technology*. – 2013. – Vol. 56. – P. 349–356.
261. Fallah-Ziarani M. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary leaf of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the GCHI gene / M Fallah-Ziarani, R. Haddad, Gh. Garoosi, M. Jalali // *Iran J Gen Plant Breed*. – 2013. – Vol. 2. – P. 47–55.
262. LI Wei-huan et al. Establishment of the genetic transformation system of *Limonium sinense* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / LI Wei-huan et al. // *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. – 2008. – Vol. 7. – P. 2668–2669.
263. Palla K. J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Fraxinus americana* hypocotyls / K. J. Palla, P. M. Pijut // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. – 2015. – Vol. 120. – P. 631–641.
264. Ling H.-Q. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / H.-Q. Ling, D. Kriseleit, M. W. Ganal // *Plant Cell Rep*. – 1998. – Vol. 17. – P. 843–847.
265. Gorbatyuk I. R. Effect of antibiotic ceftriaxone on elimination of ABI and GV3101 strains of *Agrobacterium tumefaciens* / I. R. Gorbatyuk, I. S. Gnatyuk, M. A. Bannikova // *Biopolymers and Cell* – 2015. – Vol. 31. – P. 455–457.
266. Grewal D. et al. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice / D. Grewal et al. // *Biotechnol. J*. – 2006. – Vol. 1. – P. 1158–1162.

267. Sujana P. Influence of Bavistin, Cefotaxime, Kanamycin and Silver Thiosulphate on plant regeneration of *Mentha piperita* (L.) – An important multipurpose medicinal plant / P. Sujana, C. Naidu // Journal of Phytology. – 2011. – Vol. 3. – P. 36–40.
268. Бавол А. В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур / А. В. Бавол, О. В. Дубровна, О. М. Гончарук, С. С. Воронова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 15. – С. 16–19.
269. Rees M. et al. Partitioning the Components of Relative Growth Rate: How Important Is Plant Size Variation? / M. Rees et al. // The american naturalist. – 2010. – Vol. 176. – P. 152–161.
270. Holford P. The effects of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus* / P. Holford, H. Newbury // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 93–96.
271. Tambarussi E. V. et al. Influence of antibiotics on indirect organogenesis of Teak / E. V. Tambarussi et al. // Ann. For. Res. – 2015. – Vol. 58. – P. 177–183.
272. Yao Q. et al. Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency / Q. Yao et al. // Mol. Biol. Rep. – 2007. – Vol. 34. – P. 61–67.
273. Mitic' N. The procedure providing enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat / N. Mitic', B. Vinterhalter, S. Ninkovic', D. Dodig // Biologia. – 2014. – Vol. 69. – P. 1668–1677.
274. Ishida Y. High efficiency wheat transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Ishida, Y. Hiei, T. Komari // Advances in wheat genetics : from genome to field : Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium. – 2015. – Чеп. 18. – P. 167–173.
275. Бавол А. В. Оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсів м'якої пшениці / А. В. Бавол, С. С. Воронова,

- О. В. Дубровна // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47 – С. 58–65.
276. Sarker R. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) / R. Sarker, A. Biswas // Plant Tissue Culture. – 2002. – Vol. 12. – P. 155–165.
277. Wang Y. Q. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) / Y. Q. Wang, X. G. Xiao, A. M. Zhang // Yi Chuan Xue Bao. – 2002. – Vol. 29. – P. 260–265.
278. Kumlehn J. et al. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen culture with *Agrobacterium tumefaciens* / J. Kumlehn et al. // Plant Biotechnology Journal. – 2006. – Vol. 4. – P. 251–258.
279. Enriquez-Obregon G. A. et al. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation a procedure assisted by an antinecrotic treatment / G. A. Enriquez-Obregon et al. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 1999. – Vol. 59. – P. 159–168.
280. Hauptmann R. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae / R. Hauptmann, V. Vasil, P. Ozias-Akins // Plant Physiol. – 1988. – Vol. 86. – P. 602–606.
281. Dekeyser R. Evaluation of selectable markers for rice transformation / R. Dekeyser, B. Claes, M. Marichal // Plant Physiol. – 1989. – Vol. 90. – P. 217–223.
282. Nitovska I. O. The positive effect of antibiotic paromomycin compared with kanamycin for selection of transgenic plants with *nptII* gene on the example of *Nicotiana Tabacum* / I. O. Nitovska, I. D. Avilov, B. V. Morgun // Factors in experimental evolution of organisms. – 2015. – Vol. 17. – P. 270–273.
283. Draper J. Plant Genetic Transformation and Gene Expression – A Laboratory Manual / J. Draper, R. Scott, P. Armitage, R. Walden (eds.). – Blackwell, Oxford. – 1988. – 355 p.

284. Pantazis Ch. J. et al. Development of an efficient transformation method by *Agrobacterium tumefaciens* and high throughput spray assay to identify transgenic plants for woodland strawberry (*Fragaria vesca*) using *NPTII* selection / Ch. J. Pantazis et al. // Plant Cell Rep. – 2013. – Vol. 32. – P. 329–337.
285. Verma L. Standardization of selective lethal dose of antibiotics (hygromycin and paromomycin) for selection of transgenics in durum wheat / L. Verma, N. Bains, S. Gosal // Journal of Cell and Tissue Research. – 2014. – Vol. 14. – P. 4671–4676.
286. Torbert K. A. Use of paromomycin as a selective agent for oat transformation / K. A. Torbert, H. W. Rines, D. A. Somer // Plant Cell Reports. – 1995. – Vol. 14. – P. 635–640.
287. Blanc G. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mu" / G. Blanc, C. Baptiste, G. Oliver, F. Martin, P. Montoro // Arg. plants Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 24. – P. 724–733.
288. Mahalakshmi A. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Mahalakshmi, P. Khurana // J. Plant Biochem. Biotechnol. – 1995. – Vol. 4. – P. 55–59.
289. Hussain J. et al. Biotechnologies used in genetic transformation of *Triticum aestivum*: A mini overview / J. Hussain et al. // FUUAST J. BIOL. – 2013. – Vol. 3. – P. 105–109.
290. Jasdeep C. Genetic transformation and transgenic wheat development: an overview / C. Jasdeep, T. Avijit // Clon Transgen. – 2015. – Vol. 5. – P. 147–148.
291. Гончарук О. М. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці *in planta* з використанням гена орнітинамінотрансферази / О. М. Гончарук, А. В. Бавол, О. В. Дубровна // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 15. – С. 131–135.

292. Горбатюк І. Р. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подолянка та ярого сорту Bobwhite / І. Р. Горбатюк, А. В. Бавол, Б. В. Моргун // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т.15. – С. 35–39.
293. Vox M. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis / M. Vox, V. Coustham, C. Dean, J. Mylne. // Plant Methods. – 2011. – Vol. 7. – С. 1–10.