

Експресія генів *gus* та *gfp* у амфідиплоїдної пшениці спельти (*Triticum spelta* L.) після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

А. В. Кирієнко^{1,2*}, М. В. Кучук¹, Н. Л. Щербак¹, М. Ф. Парій^{2,3}, Ю. В. Симоненко^{1,2}

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 1486, м. Київ, 03143, Україна, *e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Всеукраїнський науковий інститут селекції, вул. Васильківська, 30, м. Київ, 03022, Україна

³Національний університет біоресурсів та природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

Мета. Дослідити експресію генів *gus* та *gfp* в калюсних експлантах амфідиплоїдної пшениці спельти (*Triticum spelta* L.) після *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації. **Методи.** Для трансформації було обрано сорт пшениці спельти озимої 'Європа'. Як експланти використовували калюси, отримані із зрілих зародків. Прекультивувацію калюсів здійснювали на живильному середовищі МС (Murasige–Скуга), доповненому 2 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) та 10 мг/л нітратом срібла. Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* Conn., штам GV3101, та генетичну конструкцію з репортерними генами *gus* [ген бета-глюкуронідази (β -glucuronidase)] та *gfp* [ген зеленого флюоресцентного білка (Green Fluorescent Protein, GFP)]. Калюси трансформували шляхом інокуляції з агробактеріями та вакуумною інфільтрацією. Далі їх ко-культивували на середовищі МС із 2 мг/л 2,4-Д та 10 мг/л AgNO_3 , але без антибіотиків. Експресію гена *gus* перевіряли за допомогою гістохімічного, а гена *gfp* – візуального аналізу (флуоресценція білка GFP в УФ світлі). Рівні експресії генів *gfp* та *gus* оцінювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Інтеграцію генів *gfp* та *gus* в геном спельти перевіряли методом ПЛР. **Результати.** Генетична трансформація калюсних експлантів спельти шляхом їхньої інокуляції в живильному середовищі з агробактеріями та вакуумною інфільтрацією відбувалась з різною частотою. Рівень експресії гена *gus* за вакуумної інфільтрації становив $4,66 \pm 0,74\%$, за інокуляції – $4,00 \pm 0,91\%$; а гена *gfp* за вакуумної інфільтрації – $3,66 \pm 0,74\%$, за інокуляції – $4,66 \pm 1,39\%$. Рівень експресії гена *gfp* був вищим у разі використання інокуляції з агробактеріями, а гена *gus* – при вакуумній інфільтрації. За допомогою ПЛР-аналізу було підтверджено інтеграцію генів *gfp* та *gus* в геном калюсів спельти. Довжина ПЛР продукту із праймерами до гена *gus* становила 240 п. н., а до гена *gfp* – 717 п. н. **Висновки.** Використання методів вакуумної інфільтрації та інокуляції для генетичної трансформації спельти дали різні результати. Частота генетичної трансформації коливалась від 3,66 до 4,66%. *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація амфідиплоїдної пшениці спельти дозволяє дослідити експресію репортерних генів *gus* та *gfp* за використання калюсних експлантів, отриманих із зрілих зародків.

Ключові слова: *Triticum spelta* L.; спельта; калюсогенез; ген *gus*; ген *gfp*; генетична трансформація.

Вступ

Для створення нових сортів та ліній амфідиплоїдної пшениці залучають її різноманітні форми, які мають господарсько-цінні ознаки із максимальним проявом. До таких ознак відносять сумарну масу 1000 зерен, висоту рослин, її опірність виляганню, високий уміст білка в зерні, стійкість проти ураження хворобами та ушкодження шкідниками тощо. Наразі у світі спостерігають збіднення генофонду амфідиплоїдних пшениць. Воно пов'язане із

використанням у роботі багатьох генотипів, що не сильно різняться між собою. Крім того, фактично кожне десятиліття з'являються нові штами збудників інфекційних хвороб рослин і змінюються кліматичні умови.

Традиційна селекція не завжди встигає задовольнити потреби суспільства, а іноді це просто неможливо. Тому доцільно вдаватись до інших методів одержання нових форм амфідиплоїдної пшениці. До таких нових методів відносять генетичну трансформацію рослин, яка буває як прямою, так і непрямою. Пряма генетична трансформація відбувається при біобалістичному бомбардуванні експлантів рослин частинками золота або вольфраму, на які нашаровують плазмідну ДНК [1]. Непряма відбувається за участі відповідного штаму агробактерій та є досить поширеним методом [2]. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація може відбуватись шляхом інокуляції експлантів агробактеріями в рідкому живильному середовищі впродовж певного часу, протягом якого агробакте-

Anastasiia Kyriienko

<https://orcid.org/0000-0002-8117-5288>

Myroslav Parii

<https://orcid.org/0000-0001-9877-2241>

Nikolay Kuchuk

<https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Natalia Shcherbak

<https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

Yuri Symonenko

<https://orcid.org/0000-0002-5597-3315>

рії поступово проникають в тканини експлантів [2–4], або шляхом вакуумної інфільтрації – коли в спеціальних умовах створюють різницю тиску між замкнутою камерою та навколишнім середовищем, що дозволяє агробактеріям проникати до тканин [5, 6].

Важливим етапом роботи є вибір робочого штаму *Agrobacterium tumefaciens* Conn. З літературних джерел відомо, що для генетичної трансформації використовують штами ЕНА105 [7], AGL-1 [2, 8, 9, 10], GV3101 [11], LBA4404 [2] та інші. Зазвичай, використовують нічну культуру агробактерій, яку нарощують у рідкому живильному середовищі LB (Лурія–Бертрані) за температури 28 °C [10, 12]. Експлантами для генетичної трансформації в амфідиплоїдній пшениці можуть бути як зрілі [10, 13], так і незрілі зародки [8, 14]. Перед трансформацією проводять прекультивування експлантів на живильному середовищі MC з ауксином. Для м'якої пшениці найкраще підходить 2,4-Д у концентраціях 2–4 мг/л [2, 13, 15]. Зазвичай прекультивування проходить у темряві та може тривати кілька діб [2, 16]. Це залежить від особливостей обраного генотипу пшениці та від умов культивування (температура, відносна вологість, склад живильного середовища тощо).

Генетичну трансформацію калюсних експлантів зазвичай проводять, зануривши їх у суспензію відповідного штаму агробактерій у рідкому живильному середовищі. Для роботи агробактеріальна суспензія має бути певної концентрації, оптична щільність (OD_{600} – Optical Density) якої залежить від вибраного робочого штаму і складу культурального середовища та може варіювати в межах від 0,4 до 3 [2, 14, 17, 18].

Під час інокуляції агробактерії разом з експлантами вносять до рідкого інокуляційного середовища, склад якого може відповідати середовищу MC [18, 19] або близькому до нього та містити регулятори росту [17]. Відомо, що для покращення позитивного хемотаксису агробактерій до їхньої суспензії можна додавати сполуки фенольної природи, зокрема ацетосірінгон в концентрації 200–400 μ M [14, 20]. Інокуляція може тривати від 15 хв до кількох годин, залежно від типу експлантів. Для свіжовиділених незрілих зародків амфідиплоїдних пшениць вона може тривати до 3 год при температурі 23–25 °C, натомість для прекультивованих незрілих зародків – до 1 год, а для ембріогенного калюсу – до кількох годин [2].

Після інокуляції в живильному середовищі з агробактеріями рослинні експланти переносять на середовище без антибіотиків і

нітрату срібла в темряву на кілька діб для ко-культивування. Далі їх відмивають від агробактерій в розчині антибіотику, наприклад, цефтриаксону або тіментину [2, 16], а відмиті калюсні експланти переносять на живильне середовище для регенерації, яке може містити селективний агент. Найчастіше селективними речовинами можуть бути гербіциди – фосфінотрицин [2, 17] або гліфосат [21]. Вибір селективного агента залежить від перенесеного гена стійкості, який інтегрують в рослинний геном під час трансформації. Так, для гена *bar* (фосфінотрицин N-ацетилтрансфераза) використовують фосфінотрицин [22], а для гена *epsps* (5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтаза) – гліфосат [21]. Для відбору рослин-трансформантів крім селективних генів також використовують репортерні гени, наприклад, ген *gfp*. Продукт його експресії проявляє зелену флуоресценцію при ультрафіолетовому опроміненні (УФ) [23, 24]. Іншим маркерним репортерним геном є ген *gus*. Продукт його експресії при гістохімічній реакції взаємодії із X-Gluc (5-бромо-4-хлоро-1Н-індол-3-іл β -D-глюкопіранозидуронова кислота) забарвлює тканини трансформантів у блакитний колір [4].

Важливим для подальшої регенерації рослин є рН середовища для інокуляції, концентрація ацетосірінгону і температура. Показано, що при рН 5,8 та 200 μ M ацетосірінгону в середовищі при температурі 22 °C частота регенерації трансформованих експлантів пшениці була біля 10,5%, натомість при рН 5,0, 200 μ M ацетосірінгону і температурі 22 °C частота вже сягала 22,3%. При концентрації 400 μ M ацетосірінгону, рН 5,0 та температурі 19 °C, частота регенерації зростала до 30,3% [20].

Спельта (*Triticum spelta* L.) належить до рідких видів амфідиплоїдних пшениць. На відміну від м'якої пшениці, для спельти відсутня інформація щодо її генетичної трансформації з метою отримання нових трансгенних ліній. Зважаючи на це, новизна роботи полягала у тому, що вперше було представлено дані з генетичної трансформації калюсних експлантів спельти, які було отримано зі зрілих зародків.

Мета досліджень – дослідити експресію генів *gus* та *gfp* в калюсних експлантах амфідиплоїдній пшениці спельти (*Triticum spelta* L.) після *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації.

Матеріали та методика досліджень

Для роботи використовували зерно озимої амфідиплоїдній пшениці спельти (*Triticum*

spelta L.) сорту 'Європа' ($2n = 42$), яке було надано ТОВ 'Всеукраїнський науковий інститут селекції' (ТОВ 'ВНІС'). Для генетичної трансформації було обрано саме цей генотип спельти, оскільки попередні дослідження показали, що сорт 'Європа' найкраще демонструє себе в культурі *in vitro* [25]. Як експланти для введення в культуру *in vitro* використовували зрілі зародки. Поверхневу стерилізацію зерна проводили в 96% етиловому спирті протягом 5 хв, у 5% розчині гіпохлориту натрію – протягом 10 хв, і тричі відмивали стерильною дистильованою водою.

Індукцію калюсогенезу проводили на стандартному середовищі МС [19] із умістом мальтози 3% («Duchefa Biochemie», Нідерланди), що було доповнено 2,5 мг/л 2,4-Д («Duchefa Biochemie», Нідерланди), 10 мг/л нітрату срібла та 300 мг/л цефтриаксону («Артеріум», Україна), який додавали в середовище для запобігання бактеріальній контамінації саме в такій концентрації. Експланти культивували в темряві за температури 24 °С впродовж 14 діб.

Для генетичної трансформації калюсних експлантів використовували нічну культуру агробактерій *Agrobacterium tumefaciens* Conn., штам GV3101. Для цього агробактерії вирощували в рідкому живильному середовищі LB [12] із додаванням антибіотиків (50 мг/л

рифампіцину («Борщагівський ХФЗ», Україна), 100 мг/л канаміцину («Артеріум», Україна) та 25 мг/л гентаміцину («Артеріум», Україна) при температурі 28 °С. Кінцеву оптичну щільність агробактерій доводили до $OD_{600} = 0,8$.

Для генетичної трансформації калюсних експлантів використовували генетичну конструкцію рSPN2401, яка містила два репортерних гени: ген *gfp*, виділений з *Aequorea victoria* Marbach & Shearer, під контролем промотору гена *lhb*, що кодує хлорофіл *a-b* зв'язуючі білки (LHB), який було виділено з різущки Таля [Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.], та ген *gus* під контролем промотору гена *rbc*, що кодує малу субодиницю рибулозобісфосфаткарбоксілази (RuBisCo), також виділеного з *A. thaliana* (L.) Heynh. Обидва гени знаходились під контролем 35S термінатора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV – Cauliflower Mosaic Virus) разом з сигналом поліаденювання та 3'-последовністю, що не транслюється. Крім цього обидві транскрипційні одиниці містили 5'-последовність Ω , що не транслюється (UTR), з вірусу тютюнової мозаїки TMV (вірус тютюнової мозаїки – Tobacco Mosaic Virus) (рис. 1). Ген *gfp* кодує зелений флуоресцентний білок GFP (Green Fluorescent Protein), а продуктом активності гена *gus* є фермент β -глюкуронідаза.



Рис. 1. Структурні елементи Т-ДНК вектору рSPN2401 для генетичної трансформації калюсних експлантів спельти

Генетичну трансформацію калюсних експлантів спельти проводили шляхом їхньої інокуляції суспензією агробактерій та вакуумною інфільтрацією. Результати для обох видів трансформації порівнювали між собою. У першому випадку для інокуляції використовували аналогічне для калюсогенезу живильне середовище з додаванням 40 мг/л ацетосірінгону. Калюсні експланти культивували із суспензією агробактерій в темряві при 24 °С упродовж 2 год. Ко-культивування проводили в живильному середовищі МС для калюсогенезу, але без антибіотиків і нітрату срібла, в темряві упродовж 3 діб. Далі калюси переносили на середовище із антибіотиком і культивували в темряві ще 5 діб.

У разі вакуумної інфільтрації калюсні експланти вносили у рідке живильне середовище з агробактеріями, аналогічне за складом до середовища для інокуляції. Для цього вико-

ристовували скляний ексікатор із шліфованими краями об'ємом 2 л, до якого шлангом під'єднували насос, що викачував із нього повітря та створював умови вакууму. В середині ексікатора розміщували банки із рідким живильним середовищем, в якому знаходились калюсні експланти та суспензія агробактерій. Ексікатор щільно закривали та викачували з нього повітря. Інфільтрацію проводили у два етапи, кожен тривалістю 10 хв при 0,6 атмосферах. Умови ко-культивування були аналогічними як при прекультивуванні.

Для елімінації агробактерій калюсні експланти відмивали у розчині антибіотику цефтриаксону при концентрації 300 мг/л.

Частоту генетичної трансформації калюсних експлантів спельти визначали після 5 доби. Для виявлення продукту експресії гена *gfp* трансформовані калюси опромінювали ультрафіолетовим світлом та проводили під-

рахунок зелених калюсів, у яких спостерігали експресію гена *gfp*. Для аналізу рівня експресії гена *gus* в калюсних експлантах було проведено гістохімічний аналіз експресії гена β -глюкуронідази згідно методики Jefferson (1987) в 100 мМ фосфатному буфері рН 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc [26]. На 6-й день після трансформації фрагменти калюсів інкубували протягом 24 годин в 1 мМ розчині X-Gluc при температурі 37 °С з наступним відмиванням в 70% розчині етилового спирту також при 37 °С до 48 год.

Оцінювали рівень експресії генів *gus* та *gfp*, який проявлявся у вигляді блакитного забарвлення або яскраво зеленого свічення в ультрафіолетовому світлі, відповідно, за допомогою програми ImageJ [27]. Трансформовані калюсні експланти фотографували, зображення обробляли в ресурсі ImageJ, у результаті чого ділянки експресії генів в тканинах набували сірого забарвлення різної інтенсивності. Після вимірювання інтенсивності сірого кольору отримували відповідний графік. Рівень інтенсивності сірого забарвлення відповідав рівню експресії генів *gus* та *gfp*. Чим вищою була інтенсивність сірого кольору, тим вищим був рівень експресії генів *gus* та *gfp* (рис. 2).

Через 30 днів після генетичної трансформації із зразків трансформованих калюсів з експресією генів *gfp* та *gus* виділяли сумарну рослинну ДНК методом ЦТАБ (цетилтриметиламоніум бромід) [28]. Концентрацію виділеної ДНК визначали спектрофотометричним методом (як негативний контроль брали mQ H₂O). ПЛР реакцію проводили з праймерами до генів *gus* та *gfp*. Так, для гена *gus* використовували наступну послідовність праймерів: GUS-F – ATGGGTCAGTCCSTTATGTTA, GUS-R – АТАААGACTTCGCGCTGAT; а для гена *gfp* – GFP-F – GTGAGCAAGGGCGAGGA, GFP-R – ТТАСТТGTACAGCTCGTCCAT. Послідовності праймерів підбирали, використовуючи онлайн-ресурс NCBI BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Продукти ампліфікації ПЛР розділяли в 1% агарозному гелі. У ролі маркера молекулярної довжини використовували 3 Kb «DNA Ladder M25» («Sib Enzyme», РФ). Для ПЛР брали реакційну суміш загальним об'ємом 20 мкл, яка містила 10^x ПЛР-буфер (100 мМ Трис-НCl, рН 8,8, 500 мМ KCl, 1% Тритон X-100); 1,5 мМ MgCl₂ («Thermo Fisher Scientific», США); по 0,2 мМ кожного dNTP («Thermo Fisher Scientific», США); пару відповідних праймерів, кожен у концентрації 12,5 рМ; Taq-полімерази в концентрації 1 U («Sib Enzyme», РФ). Концентрація рослинної

ДНК в ПЛР-суміші становила 100 нг. У ролі позитивного контролю використовували плазмідну ДНК, а для негативного – H₂O.

Виходячи з того, що працювали з двома репортерними генами та за двома методиками трансформації, було виділено 4 групи експериментів – *gus*:інфільтрація, *gus*:інокуляція, *gfp*:інфільтрація та *gfp*:інокуляція. Кожна група складалась з 5 повторів по 60 калюсних експлантів кожен. Загальна сума експлантів по групі складала 300 шт.

Частоту генетичної трансформації визначали за формулою, яку було взято та адаптовано зі статті Gouranga U. зі співавт. [29]: $(T / E) \times 100$, де T – кількість калюсів, в яких детектували продукт експресії відповідних генів, E – загальна кількість калюсних експлантів, які було використано для генетичної трансформації.

Результати досліджень

Після генетичної трансформації калюсних експлантів спелти шляхом інокуляції з агробактеріями через 8 днів спостерігали експресію генів *gus* та *gfp*, яка може бути як транзійтною, так і стабільною. За візуальними спостереженнями експресію гена *gfp* в клітинах калюсних експлантів виявляли вже на 5-у добу після їхньої трансформації. Під ультрафіолетовим освітленням калюси, в яких спостерігали цю експресію, світилися яскраво зеленим кольором (рис. 3А). Свічення могло бути як точковим, тобто експресію спостерігали лише в окремих клітинах калюсу, так і повним – світився весь експлант. Частота генетичної трансформації для гена *gfp* у разі інокуляції з агробактеріями складала $4,66 \pm 1,39\%$ (табл. 1).

У разі біобомбардування незрілих зародків пшениці м'якої сорту 'AvocetYr10' частинками золота із генетичною конструкцією, що має репортерний ген *gfp*, Kronbak R. зі співавт. (2014) візуально відмічали транзійтну експресію гена *gfp* в ендоспермі пшениці м'якої [30]. Для порівняння, відомо, що частота стабільної генетичної трансформації з використанням конструкцій, що містять селективні гени для відбору трансгенних ліній пшениці на відповідних селективних середовищах, 14-денних ембріонних калюсів амфідиплоїдної ярої пшениці шляхом інокуляції з агробактеріями складала 1,2–3,9%, а іноді вона сягала до 5,9% [2]. Як зазначає Dale P. J. та співавт., якщо проводити вакуумну інфільтрацію при 6 підходах загальною тривалістю 1 год, то частота генетичної трансформації може бути біля 8% [5].

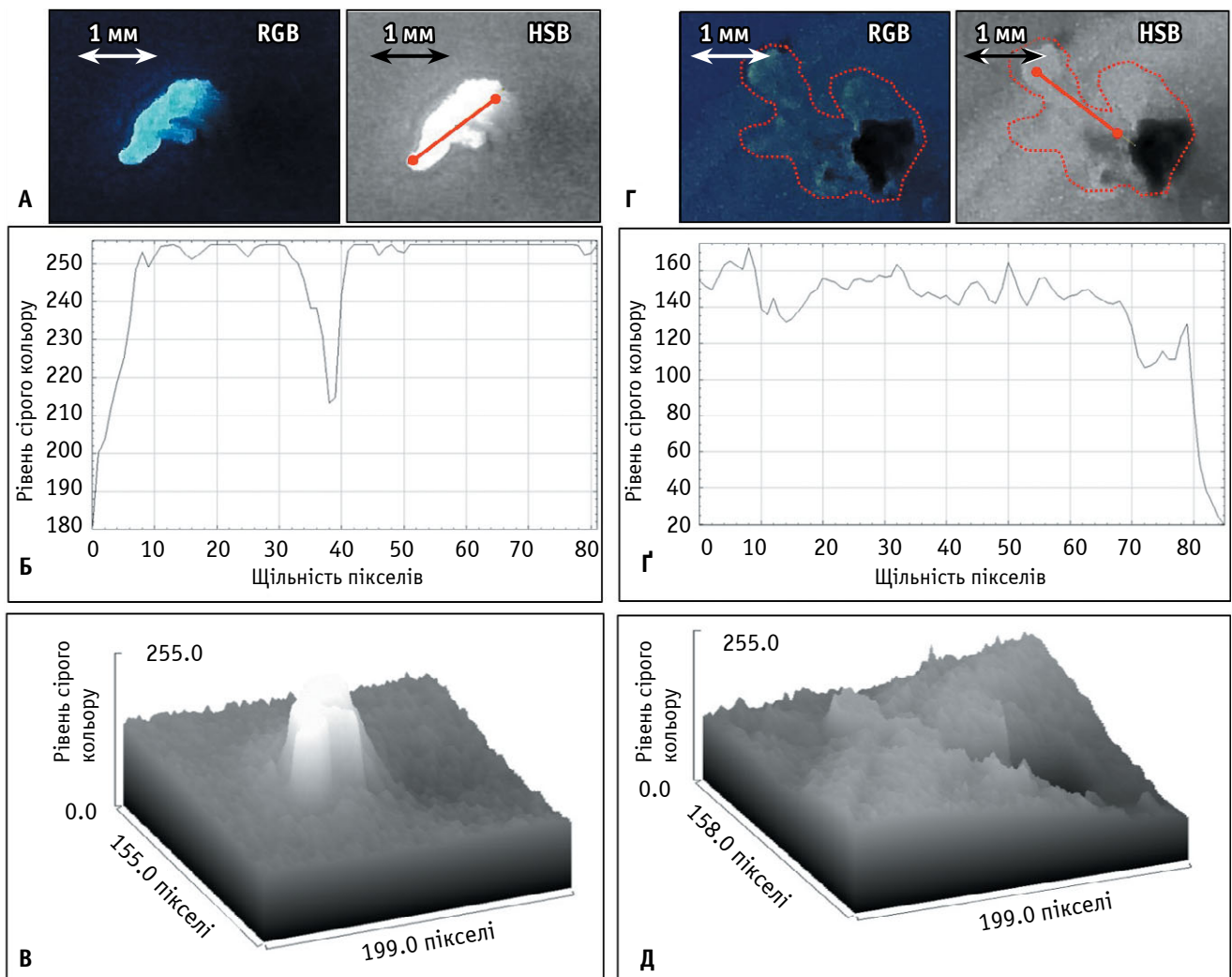


Рис. 2. Оцінка рівня експресії гена *gfp* у калюсних експлантах спельти з високим (А–В) та невисоким (Г–Д) рівнем експресії (програма ImageJ): А) та Г) – ‘RGB’ та ‘HSB’ зображення калюсних експлантів, в тканині яких був високий (А) та невисокий (Г) рівень експресії гена *gfp* (червоною лінією вказано ділянку виміру рівня інтенсивності, червоним пунктиром позначено калюс для кращої орієнтації); Б) та Д) – графіки рівня інтенсивності сірого кольору, що відповідають зеленому свіченню при експресії гена *gfp*; В) та Д) – 3-D моделі співвідношення різних відтінків сірого кольору для калюсу з високим та невисоким рівнем експресії, відповідно

У наших експериментах за вакуумної інфільтрації частота генетичної трансформації, виходячи з результатів по гену *gfp*, була трохи меншою, ніж при інокуляції, а саме $3,66 \pm 0,74\%$. Водночас із тим, інтенсивність флуоресценції білка GFP в калюсних експлантах також була меншою попереднього варіанту. Зокрема, для оцінки рівня експресії гена *gfp* після інокуляції з агробактеріями рівень інтенсивності сірого кольору був у межах значень 210–255, а для вакуумної інфільтрації переважали значення 100–250. Приклад оцінювання рівня експресії гена *gfp* у калюсних експлантах спельти з високим і невисоким рівнем експресії представлено на рисунку 2.

Далі було проведено ПЛР аналіз з праймерами до гена *gfp*, який показав наявність інтеграції гена *gfp* в геном калюсних експлан-

тів зі зрілих зародків спельти як у випадку їхньої генетичної трансформації шляхом інокуляції, так і вакуумною інфільтрацією (рис. 4). За результатами аналізу було виявлено ПЛР продукт довжиною біля 717 п. н., що відповідало очікуваним розмірам гена *gfp* [23].

Таким чином, експресія гена *gus* в калюсних експлантах за використання інокуляції з агробактеріями склала $4,00 \pm 0,91\%$. Натомість у разі вакуумної інфільтрації вона була трохи вищою – $4,66 \pm 0,74\%$ (табл. 1). Як зазначає Dattgondе N. та співавт. [6], при вакуумній інфільтрації зрілих зародків вівса посівного (*Avena sativa* L.) частота генетичної трансформації по гену *gus* за результатами гістохімічного аналізу складала 11–21%.

Для порівняння, відомо, що генетична трансформація шляхом інокуляції незрілих

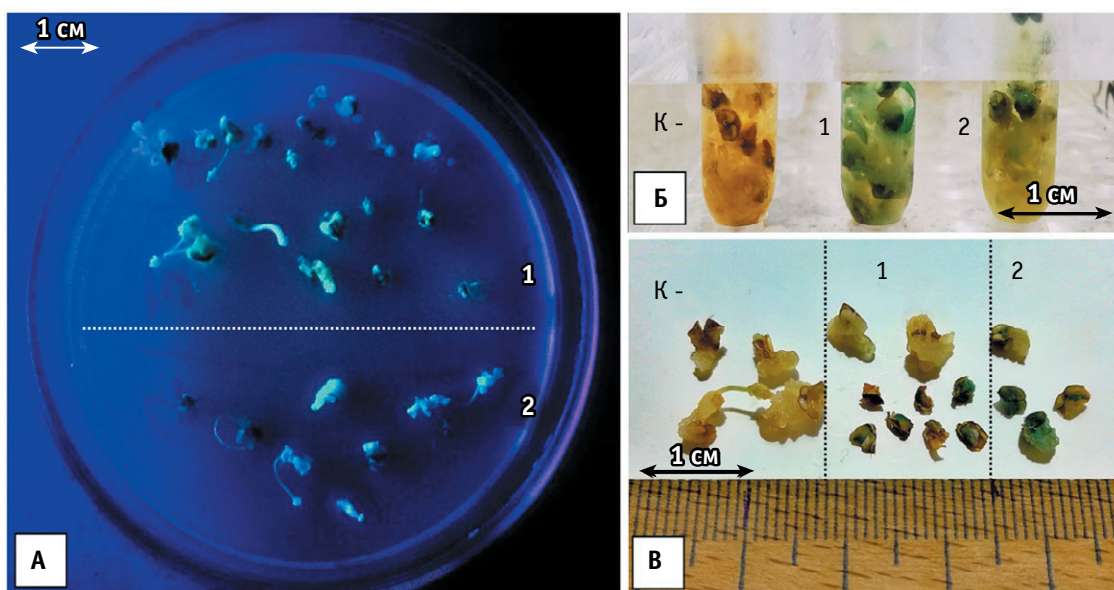


Рис 3. Детектування експресії генів *gfp* та *gus* в калюсних експлантах спельти: А) експресія гена *gfp* в 20-денних калюсах спельти на 6 добу після генетичної трансформації (1 – інокуляція із агробактеріями, 2 – вакуумна інфільтрація); Б) та В) експресія гена *gus* у 20-денних (Б) та 30-денних (В) калюсах на 7 добу після генетичної трансформації ('К-' – негативний контроль, нетрансформовані калюси; 1 – вакуумна інфільтрація; 2 – інокуляція із агробактеріями).

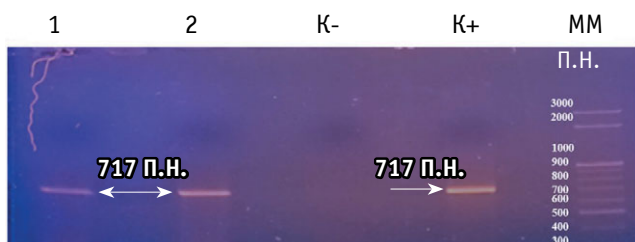


Рис. 4. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації сумарної рослинної ДНК трансформантів спельти (праймери до гена *gfp*): 1) ДНК трансформанту після інокуляції з агробактеріями, 2) ДНК трансформанту після вакуумної інфільтрації, 'К-' – негативний контроль (H_2O), 'К+' – позитивний контроль (генетична конструкція rSPN2401)

зародків амфідиплоїдної пшениці сорту 'Bobwhite' з агробактеріями, що містять генетичну конструкцію з геном *gus*, дає до 76% транз'єнтної експресії [18]. Це відбувається за наявності ацетосірінгону в концентрації 40 мг/л. Якщо трансформацію проводити без ацетосірінгону, то, як зазначають Wu H. та співавт. [18], кількість експлантів із експресією гена *gus* буде на рівні 52%.

Експресію гена *gus* в тканинах калюсних експлантів при проведенні гістохімічного аналізу експресії β -глюкуронідази виявляли з різним рівнем інтенсивності (після реакції із X-Gluc калюсні тканини набувають блакитного кольору різної інтенсивності) (рис. 3Б, 3В). Вона могла охоплювати або всі калюсні клітини, або могла спостерігатись лише в окремих клітинах. Приклад оцінювання рівня

експресії гена *gus* у калюсних експлантах спельти з високим та невисоким рівнем експресії представлено на рисунку 5.

Рівень інтенсивності сірого забарвлення для двох варіантів генетичної трансформації дещо відрізнявся. Так, за використання вакуумної інфільтрації інтенсивність була вищою і варіювала в діапазоні 0–250 значень (здебільшого тримаючись в межах 160–250). Натомість за інокуляції рівень інтенсивності сірого кольору рідко перевищував значення 160 і здебільшого тримався в межах значень від 130 до 160.

Далі було проведено ПЛР аналіз із праймерами до гена *gfp*, який показав наявність інтеграції гена *gus* в геном калюсних експлантів із зрілих зародків спельти як у разі їхньої генетичної трансформації шляхом інокуляції, так і вакуумною інфільтрацією (рис. 6). ПЛР аналіз із праймерами до гена *gus* виявив амплікон довжиною біля 240 п. н., що відповідає очікуваним розмірам гена *gus* і також складає біля 240 п. н. [31].

Таким чином, уперше показано експресію генів *gus* та *gfp* в калюсних експлантах спельти (*Triticum spelta* L.) після генетичної трансформації шляхом вакуумної інфільтрації та інокуляції агробактеріями. Середня частота генетичної трансформації за використання обох методик дещо відрізнялась. Так, для репортерного гена *gus* вакуумна інфільтрація виявилась ефективнішою за інокуляцію (4,66% та 4,00%, відповідно). Натомість для гена *gfp* більша частота гене-

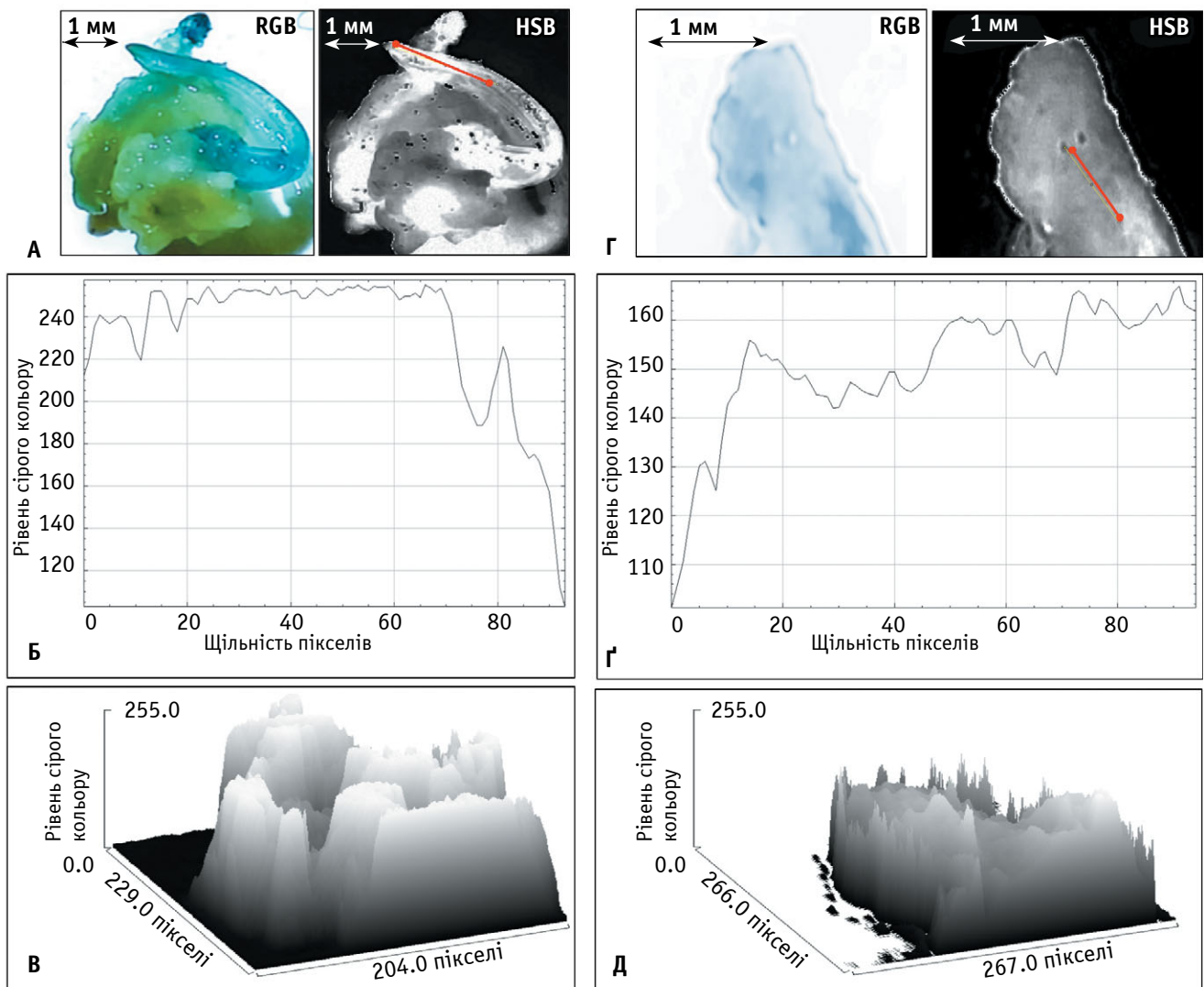


Рис 5. Оцінка рівня експресії гена *gus* у калюсних експлантах спельти з високим (А–В) та невисоким (Г–Д) рівнем експресії (програма ImageJ): А) та Г) – ‘RGB’ та ‘HSB’ зображення калюсних експлантів, в тканині яких був високий (А) та невисокий (Г) рівень експресії гена *gus* (червоною лінією позначено ділянку виміру рівня інтенсивності); Б) та Г) – графіки рівня інтенсивності сірого кольору, що відповідають блакитному забарвленню при експресії гена *gus*; В) та Д) – 3-D моделі співвідношення різних відтінків сірого кольору для калюсу з високим та невисоким рівнем експрес, відповідно

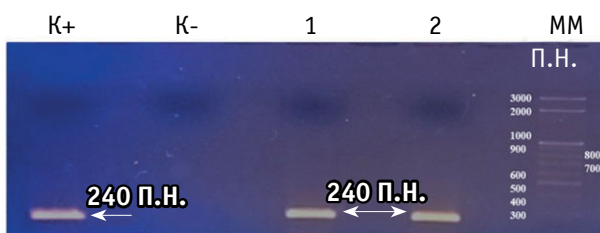


Рис 6. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації сумарної рослинної ДНК трансформантів спельти (праймери до гена *gus*):

- 1) ДНК трансформанту після інокуляції з агробактеріями, 2) ДНК трансформанту після вакуумної інфільтрації, ‘K-’ – негативний контроль (H₂O), ‘K+’ – позитивний контроль (генетична конструкція pSPN2401)

тичної трансформації була за інокуляції, ніж при вакуумній інфільтрації (4,66% та 3,66%, відповідно). У наших експериментах експресія репортерних генів *gus* та *gfp* могла бути як тимчасовою (транз'єнтною), так і стабільною.

Висновки

Таким чином, уперше показано експресію генів *gus* та *gfp* в калюсних експлантах спельти (*Triticum spelta* L.) після генетичної трансформації шляхом вакуумної інфільтрації та інокуляції агробактеріями. Використання методів вакуумної інфільтрації та інокуляції для генетичної трансформації спельти давали різний результат. Загалом, частота генетичної трансформації калюсних

Таблиця 1

Частота генетичної трансформації калюсних експлантів пшениці сорту 'Європа'

Репортерний ген / варіант генетичної трансформації	Повтор	Кількість калюсних експлантів (шт.)	Кількість калюсів із експресією репортерного гена (шт.)	Частота трансформації (%)	Середня частота трансформації (%), X ± S
<i>gus</i> / інфільтрація	1	60	3	5,00	4,66 ± 0,74
	2	60	2	3,33	
	3	60	3	5,00	
	4	60	3	5,00	
	5	60	3	5,00	
<i>gus</i> / інокуляції	1	60	2	3,33	4,00 ± 0,91
	2	60	3	5,00	
	3	60	3	5,00	
	4	60	2	3,33	
	5	60	2	3,33	
<i>gfp</i> / інфільтрація	1	60	2	3,33	3,66 ± 0,74
	2	60	2	3,33	
	3	60	3	5,00	
	4	60	2	3,33	
	5	60	2	3,33	
<i>gfp</i> / інокуляції	1	60	2	3,33	4,66 ± 1,39
	2	60	3	5,00	
	3	60	4	6,66	
	4	60	2	3,33	
	5	60	3	5,00	

Примітка. X – середнє значення, S – похибка вибіркової середньої.

експлантів із зрілих зародків спельти сорту 'Європа' за геном *gfp* у разі інокуляції складала $4,66 \pm 1,39\%$. Натомість для вакуумної інфільтрації вона була на рівні $3,66 \pm 0,74\%$. Частота генетичної трансформації за геном *gus* при вакуумній інфільтрації становила близько $4,66 \pm 0,74\%$, а за інокуляції з агробактеріями – $4,00 \pm 0,91\%$. ПЛР аналіз показав наявність обох репортерних генів *gus* та *gfp* у калюсах спельти (довжина ПЛР продукту із праймерами до гена *gus* склала 240 п. н., а для гена *gfp* – 717 п. н.). *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація амфідиплоїдної пшениці спельти (*Triticum spelta* L.) дозволяє дослідити експресію репортерних генів *gus* та *gfp* за використання калюсних експлантів, отриманих із зрілих зародків

Подяки

Роботу було виконано в рамках фундаментальної відомчої тематики відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАН України: ПІ-8-17 «Вивчення функціонування гетерологічних генів та їх впливу на адаптаційні характеристики рослинних систем в умовах біотичних та абіотичних стресів» (№ державної реєстрації 0117U002589, 2017–2021 рр).

Використана література

- Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N., & Imai, R. (2018). Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.*, 8, 14422. doi: 10.1038/s41598-018-32714-6
- Jones, H. D., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1, 5. doi: 10.1186/1746-4811-1-5
- Wu, H., Doherty, A., & Jones, H. D. (2008). Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence gens. *Transgenic Res.*, 17(3), 425–436. doi: 10.1007/s11248-007-9116-9
- Hayta, S., Smedley, M. A., Demir, S. U., Blundell, R., Hinchliffe, A., Atkinson, N., & Harwood, W. A. (2019). An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*, 26, 121. doi: 10.1186/s13007-019-0503-z
- Dale, P. J., Marks, M. S., Brown, M. M., Woolston, C. J., Gunn, H. V., Mullineaux, P. M., ... Flavella, R. B. (1989). Agroinfection of wheat: inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. *Plant Sci.*, 63(2), 237–245. doi: 10.1016/0168-9452(89)90249-5
- Dattgondé, N., Tiwari, S., Sapre, S., & Gontia-Mishra, I. (2019). Genetic transformation of oat mediated by *Agrobacterium* is enhanced with sonication and vacuum infiltration Iranian. *Iran J. Biotechnol.*, 17(1), e1563. doi: 10.21859/ijb.1563
- Kumar, R., Mamrutha, H. M., Kaur, A., Venkatesh, K., Sharma, D., & Singh, G. P. (2019). Optimization of *Agrobacterium* transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Mol. Biol. Rep.*, 46(2), 1845–1853. doi: 10.1007/s11033-019-04637-6
- Hensel, G., Marthe, C., & Kumlehn, J. (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos. *Methods Mol. Biol.*, 1679, 129–131. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_8
- He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., Wang, D. S., & Xia, L. Q. (2010). *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. *J. Exp. Bot.*, 61(6), 1567–1581. doi: 10.1093/jxb/erq035
- Medvecká, E., & Harwood, W. A. (2015). Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos. *Methods Mol. Biol.*, 1223, 199–209. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_16
- Tague, B. W., & Mantis, J. (2006). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. In J. Salinas, & J. J. Sanchez-Serrano (Eds.), *Arabidopsis Protocols*. Vol. 123.

- Methods in Molecular Biology* (pp. 215–223). (2nd Ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press. doi: 10.1385/1-59745-003-0:215
12. Luria, S. E., & Burrous, J. W. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.*, 74(4), 461–476.
 13. Chauhan, H., & Khurama, P. (2017). Wheat genetic transformation using mature embryos as explants. *Methods Mol. Biol.*, 1679, 153–210. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_10
 14. Sparks, C. A., Doherty, A., & Jones, H. D. (2014). Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.*, 1099, 235–250. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_19
 15. Dargahlou, S. A., Ulliaie, E. D., & Bandehagh, A. (2017). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of some Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *J. Bio. Env. Sci.*, 10(5), 275–283.
 16. Karami, O. (2008). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Transgenic Plant J.*, 2(2), 127–137.
 17. Ishida, Y., Tsunashima, M., Hiei, Y., & Komari, T. (2015). Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods Mol. Biol.*, 1223, 189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_15
 18. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., & Jones, H. D. (2003). Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.*, 21(7), 659–568. doi: 10.1007/s00299-002-0564-7
 19. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 20. Manfroï, E., Yamazaki-Lau, E., Grando, M. F., & Roesler, E. A. (2015). Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. *Genet. Mol. Biol.*, 38(4), 470–476. doi: 10.1590/S1415-475738420150026
 21. Aramrak, A., Kidwell, K. K., Steber, C. M., & Burke, I. C. (2015). Molecular and phylogenetic characterization of the homoeologous EPSP Synthase genes of allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* (L.). *BMC Genomics.*, 16, 844. doi: 10.1186/s12864-015-2084-1
 22. Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I., & FuKtterer, J. (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1079–1086. doi: 10.1007/s001220051170
 23. Ma, B., Mayfield, M. B., Gold, M. H. (2001). The Green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Micr.*, 67(2), 948–955. doi: 10.1128/AEM.67.2.948-955.2001
 24. Jordan, M. C. (2000). Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Rep.*, 19(11), 1069–1075. doi: 10.1007/s002990000246
 25. Kyriienko, A. V., Parii, M. F., Kuchuk, M. V., Symonenko, Yu. V., & Shcherbak, N. L. (2019). Optimisation of callusogenesis induction conditions for *Triticum spelta* L. and *T. aestivum* L. *Plant Var. Stud. Prot.*, 15(3), 259–266. doi: 10.21498/2518-1017.15.3.2019.181084
 26. Jefferson, R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387–405. doi: 10.1007/bf02667740
 27. Būziat, C., Kleine-Vehn, J., & Feraru, E. (2017). Histochemical staining of β-Glucuronidase and its spatial quantification. *Methods Mol. Biol.*, 1497, 73–80. doi: 10.1007/978-1-4939-6469-7_8
 28. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15(1), 8–15. doi: 10.1007/BF02772108
 29. Gouranga, U., Moutushi, S., & Amitava, R. (2015). *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri'. *Asian J. Plant Sci. Res.*, 5(5), 24–27.
 30. Kronbak, R., Ingvarsdn, R. C., Madsen, K. C., & Gregersen, L. P. (2014). A novel approach to the generation of seamless constructs for plant transformation. *Plant Methods.*, 10, 10. doi: 10.1186/1746-4811-10-10
 31. De Riso, V., Raniello, R., Maumus, F. et al. (2009). Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.*, 37(14), e96. doi: 10.1093/nar/gkp448

Використана література

1. Hamada H., Liu Y., Nagira Y. et al. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. 14422. doi: 10.1038/s41598-018-32714-6
2. Jones H. D., Duherty A., Wu H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods.* 2005. Vol. 1. 5. doi: 10.1186/1746-4811-1-5
3. Wu H., Doherty A., Jones H. D. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes. *Transgenic Res.* 2008. Vol. 17, Iss. 3. P. 425–436. doi: 10.1007/s11248-007-9116-9
4. Hayta S., Smedley M. A., Demir S. U. et al. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods.* 2019. Vol. 26. 121. doi: 10.1186/s13007-019-0503-z
5. Dale P. J., Marks M. S., Brown M. M. et al. Agroinfection of wheat: inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. *Plant Sci.* 1989. Vol. 63, Iss. 2. P. 237–245. doi: 10.1016/0168-9452(89)90249-5
6. Dattgonde N., Tiwari S., Sapre S., Gontia-Mishra I. Genetic transformation of oat mediated by *Agrobacterium* is enhanced with sonication and vacuum infiltration Iranian. *Iran J. Biotechnol.* 2019. Vol. 17, Iss. 1. e1563. doi: 10.21859/ijb.1563
7. Kumar R., Mamrutha H. M., Kaur A. et al. Optimization of *Agrobacterium* transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Mol. Biol. Rep.* 2019. Vol. 46, Iss. 2. P. 1845–1853. doi: 10.1007/s11033-019-04637-6
8. Hensel G., Marthe C., Kumblehn J. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos. *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1679. P. 129–131. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_8
9. He Y., Jones H. D., Chen S. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. *J. Exp. Bot.* 2010. Vol. 61, Iss. 6. P. 1567–1581. doi: 10.1093/jxb/erq035
10. Medvecká E., Harwood W. A. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos. *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1223. P. 199–209. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_16
11. Tague B. W., Mantis J. *In planta Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. *Arabidopsis Protocols.* Vol. 123. *Methods in Molecular Biology.* Totowa, New Jersey : Humana Press, 2006. P. 215–223. doi: 10.1385/1-59745-003-0:215
12. Luria S. E., Burrous J. W. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 1957. Vol. 74, Iss. 4. P. 461–476
13. Chauhan H., Khurama P. Wheat genetic transformation using mature embryos as explants. *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1679. P. 153–210. doi: 10.1007/978-1-4939-7337-8_10
14. Sparks C. A., Doherty A., Jones H. D. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1099. P. 235–250. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_19
15. Dargahlou S. A., Ulliaie E. D., Bandehagh A. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of some Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *J. Bio. Env. Sci.* 2017. Vol. 10, Iss. 5. P. 275–283.
16. Karami O. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Transgenic Plant J.* 2008. Vol. 2, Iss. 2. P. 127–137.
17. Ishida Y., Tsunashima M., Hiei Y., Komari T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1223. P. 189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_15
18. Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H. D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 21, Iss. 7. P. 659–568. doi: 10.1007/s00299-002-0564-7

19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
20. Manfroi E., Yamazaki-Lau E., Grando M. F., Roesler E. A. Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. *Genet. Mol. Biol.* 2015. Vol. 38, Iss. 4. P. 470–476. doi: 10.1590/S1415-475738420150026
21. Aramrak A., Kidwell K. K., Steber C. M., Burke I. C. Molecular and phylogenetic characterization of the homoeologous EPSP Synthase genes of allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* (L.). *BMC Genomics.* 2015. Vol. 16. 844. doi: 10.1186/s12864-015-2084-1
22. Bliffeld M., Mundy J., Potrykus I., FuKtterer J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theor Appl. Genet.* 1999. Vol. 98. P. 1079–1086. doi: 10.1007/s001220051170
23. Ma B., Mayfield M. B., Gold M. H. The Green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Micro.* 2001. Vol. 67, Iss. 2. P. 948–955. doi: 10.1128/AEM.67.2.948-955.2001
24. Jordan M. C. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Rep.* 2000. Vol. 19, Iss. 11. P. 1069–1075. doi: 10.1007/s002990000246
25. Кирієнко А. В., Парій М. Ф., Кучук М. В., Симоненко Ю. В., Щербак Н. Л. Розроблення ефективної методики індукції каллюсогенезу зі зрілих зародків *Triticum spelta* L. та *T. aestivum* L. *Plant Var. Stud. Prot.* 2019. Т. 15, № 3. С. 259–266. doi: 10.21498/2518-1017.15.3.2019.181084
26. Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. Vol. 5. P. 387–405. doi: 10.1007/bf02667740
27. Béziat C., Kleine-Vehn J., Feraru E. Histochemical staining of β -Glucuronidase and its spatial quantification. *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1497. P. 73–80. doi: 10.1007/978-1-4939-6469-7_8
28. Porebski S., Bailey L. G., Baum B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997. Vol. 15, Iss. 1. P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108
29. Gouranga U., Moutushi S., Amitava R. *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri'. *Asian J. Plant Sci. Res.* 2015. Vol. 5, Iss. 5. P. 24–27
30. Kronbak R., Ingvarsdson R. C., Madsen K. C., Gregersen L. P. A novel approach to the generation of seamless constructs for plant transformation. *Plant Methods.* 2014. Vol. 10. doi: 10.1186/1746-4811-10-10
31. De Riso V., Raniello R., Maumus F. et al. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, Iss. 14. e96. doi: 10.1093/nar/gkp448

УДК 602.7:57.085.2:633.111.5

Кириєнко А. В.^{1,2*}, Кучук М. В.¹, Щербак Н. Л.¹, Парій М. Ф.^{2,3}, Симоненко Ю. В.^{1,2} Експресія генів *gus* і *gfp* у амфидиплоїдної пшениці спельты (*Triticum spelta* L.) після *Agrobacterium*-опосередованої трансформації // *Plant Varieties Studying and Protection.* 2020. Т. 16, № 1. С. 103–113. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.16.1.2020.201377>

¹Інститут клітинної біології та генетическої інженерії НАН України, ул. Академіка Заболотного, 148б, г. Київ, 03143, Україна, *e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Всеукраїнський науковий інститут селекції, ул. Васильківська, 30, г. Київ, 03022, Україна

³Національний університет біоресурсів і природопольовання України, ул. Героїв Оборони, 15, 03041, г. Київ, Україна

Цель. Исследовать экспрессию генів *gus* і *gfp* в каллюсных експлантах амфидиплоїдної пшениці спельты (*Triticum spelta* L.) після *Agrobacterium*-опосередованої генетическої трансформації. **Методи.** Для трансформації був вибран сорт пшениці спельты озимой 'Європа'. В качестве експлантов використовували каллюсы, полученные из зрелых зародышей. Для прекультивации каллюсов использовали питательную среду МС (Мурасиге–Скуга), дополненную 2 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и 10 мг/л нитратом серебра. Для генетическої трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* Сопп., штамм GV3101, и генетическую конструкцию, содержащую репортерные гены *gus* (ген бета-глюкуронидазы) и *gfp* (ген зеленого флюоресцентного белка GFP). Каллюсы трансформировали путем инокуляции с агробактериями и вакуумной инфильтрацией. Далее их ко-культивировали на среде МС с 2 мг/л 2,4-Д и 10 мг/л AgNO₃, но без антибиотиков. Экспрессию гена *gus* проверяли с помощью гистохимического анализа, а гена *gfp* – визуального (флуоресценция белка GFP в UV свете). Уровни экспрессии генів *gfp* и *gus* оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ. Интеграция генів *gfp* и *gus* в геном спельты проверяли методом ПЦР. **Результаты.** Генетическая транс-

формация каллюсных експлантов спельты путём их инокуляции в питательной среде с агробактериями и вакуумной инфильтрацией происходила с разной частотой. Уровень экспрессии гена *gus* при вакуумной инфильтрации составил 4,66 ± 0,74%, а при инокуляции – 4,00 ± 0,91%, а гена *gfp* при вакуумной инфильтрации – 3,66 ± 0,74%, а при инокуляции – 4,66 ± 1,39%. Уровень экспрессии гена *gfp* был выше в случае использования инокуляции с агробактериями, а гена *gus* – при вакуумной инфильтрации. При помощи ПЦР анализа была подтверждена интеграция генів *gfp* и *gus* в геном каллюсов спельты. Длина ПЦР продукта с праймерами к гену *gus* составила 240 п. н., а для гена *gfp* – 717 п. н. **Выводы.** Использование методов вакуумной инфильтрации и инокуляции для генетическої трансформації спельты дали разные результаты. Частота генетическої трансформації колебалась от 3,66 до 4,66%. *Agrobacterium*-опосередованная генетическая трансформация амфидиплоїдної пшениці спельты позволяет исследовать экспрессию репортерных генів *gus* и *gfp* при использовании каллюсных експлантов, полученных из зрелых зародышей.

Ключевые слова: *Triticum spelta* L.; спельта; каллюсогенез; ген *gus*; ген *gfp*; генетическая трансформация.

UDC 602.7:57.085.2:633.111.5

Kyriienko, A. V.^{1,2}, Kuchuk, M. V.¹, Shcherbak, N. L.¹, Parii, M. F.^{2,3}, & Symonenko, Yu. V.^{1,2} (2020). Expression of *gus* and *gfp* genes in amphidiploid spelt wheat (*Triticum spelta* L.) after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Varieties Studying and Protection*, 16(1), 103–113. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.16.1.2020.201377>

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, 148b Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding, 30 Vasylykivska St., Kyiv, 03143, Ukraine

³National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine 15, Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine

Purpose. To study the expression of *gus* and *gfp* genes in callus explants of amphidiploid spelt wheat (*Triticum spelta* L.) after *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

Methods. Winter spelt wheat of 'Europa' variety was chosen for transformation. Calli obtained from mature embryos were used as explants. Callus pre-cultivation was carried out on MS nutrient medium (Murashige–Skoog) supplemented with 2 mg/L 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) and 10 mg/L silver nitrate. For genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens* Conn., strain GV3101 and a genetic construct with reporter genes beta-glucuronidase (GUS) and green fluorescent protein (GFP) were used. Calli were transformed by inoculation with agrobacteria and vacuum infiltration. Then they were co-cultured on MS medium with 2 mg/L 2,4-D and 10 mg/L AgNO₃, but without antibiotics. The expression of the *gus* gene was checked by histochemical and the *gfp* gene by visual analysis (fluorescence of the GFP protein in UV light). *Gfp* and *gus* gene expression levels were evaluated using ImajeJ software. The integration of the *gfp* and *gus* genes into the spelt genome was verified by PCR. **Results.** Genetic transformation of spelt

callus explants by inoculation in a nutrient medium with agrobacteria and vacuum infiltration occurred at different frequencies. The level of expression of the *gus* gene during vacuum infiltration was $4.66 \pm 0.74\%$, with inoculation – $4.00 \pm 0.91\%$; and the *gfp* gene with vacuum infiltration – $3.66 \pm 0.74\%$, with inoculation – $4.66 \pm 1.39\%$. The level of expression of the *gfp* gene was higher when using inoculation with agrobacteria, and the *gus* gene was higher during vacuum infiltration. Using PCR analysis, the integration of the *gfp* and *gus* genes into the callus of spelt genome was confirmed. The length of the PCR product with primers for the *gus* gene was 240 bp, and 717 bp for the *gfp* gene.

Conclusions. The use of vacuum infiltration and inoculation methods for spelt genetic transformation gave different results. The frequency of genetic transformation ranged from 3.66 to 4.66%. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of amphidiploid spelt wheat allows us to study the expression of *gus* and *gfp* reporter genes using callus explants derived from mature embryos.

Keywords: *Triticum spelta* L.; spelt; callusogenesis; *gus* gene; *gfp* gene; genetic transformation.

Надійшла / Received 14.02.2020
Погоджено до друку / Accepted 22.03.2020