

FUNKCIONÁLIS GENOMIKAI VIZSGÁLATOK MEGALAPOZÁSA: MARKERGÉN BEJUTTATÁSA BÚZÁBA (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

MIHÁLY RÓBERT¹; KONKOLY MARIANNA²; MONOSTORI TAMÁS², PAUK JÁNOS¹

¹Gabonatermesztési Kutató Kht., Biotechnológia Osztály 6701, Szeged, Pf. 391
janos.pauk@gabonakutato.hu

²Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Kar 6800 Hódmezővásárhely, Andrásy út 15.

ABSTRACT - Bases of functional genomic research: Transfer of marker gene into wheat (*Triticum aestivum* L.)

At the Department of Biotechnology of the Cereal Research Non-profit Company successful wheat transformations with different constructions have been carried out in recent years by using both the biolistic and the *Agrobacterium*-mediated methods. Successful transformation results of our laboratory invite us to spread our transformation work to a new area of research: the functional genomics of plant resistance. To base this research here we report a useful and efficient transformation method. The efficiency shows us: this method can be useful in functional genomic research. In our experiments the *bar* marker gene was introduced by particle gun into still immature embryos after five days pre-culture in 2 mg/l 2,4-D containing media followed by marker gene selection, plant regeneration and seed production. The integration of the foreign gene into the wheat genome and its expression was confirmed by PCR method with specific primers and Finale 14 SL treatment. In the present genetic transformation the pAHC20 plasmid bearing *bar* gene was used. The *bar* gene – originating from *Streptomyces hygroscopicus* – lends herbicide (phosphinothricin, PPT) resistance to the recipient organism. After bombarding 4000 embryos followed by PPT-selection 19 independent transformants were planted into soil 70 days post-bombardment. This 0.47% efficiency suggests that this can be a useful and quick method for application in functional genomic research.

Kulcsszavak: funkcionális genomika, genetikai transzformáció, búza

Keywords: functional genomics, genetic transformation, wheat

BEVEZETÉS

Napjainkban a növényi funkcionális genomikai kutatás egyik kulcsmódszerévé a genetikai transzformáció vált, ami izolált gének beépítését és így transzgenikus növények előállítását jelenti. Az ezredforduló előtti időszak kutatásai a közvetlen és közvetett génbeviteli eljárásokat rutin módszerré fejlesztették, ezáltal egyes gazdaságilag hasznos gének gyakorlati hasznosításán túl lehetőség nyílt a növényi genom eddig tisztázatlan funkciójú génjeinek alaposabb elemzésére. A gének szerepéről végleges, megbízható információt nyerhetünk a gének megváltoztatott formáinak a genomba történő beépítésével és a megváltoztatott tulajdonságok jellemzésével. A stabil géntranszformációs rendszerek kifejlesztéséig hosszú és rögös út vezetett. Sok, kezdetben biztató próbálkozás mára már szinte feledésbe merül. A rutinszerűen alkalmazott, gének százait bizonyos szempontból elemezni képes DNS chip és tranziens expressziós transzformációs rendszerek a tesztelt gének számához képest olcsóbbak és sokkal gyorsabbak, a gének valódi funkcióját tekintve viszont kevésbé informatívak. Ahhoz, hogy a kívánt géneket stabilan kifejeztessük, illetve elhallgattassuk, valóban hatékony transzformációs módszerekre van szükség. Ezek csak akkor válhatnak a funkcionális genomika effektív eszközévé, ha időben és hatékonyságban jelentős fejlesztéseket hajtunk végre. Jelen cikkünkben a részecske-belövéses módszer előnyeiről, hátrányairól, hatékonyságáról és felhasználhatóságáról értekezünk. Az emberiség egyik legfontosabb élelmiszernövénye a biotechnológiai és szövettenyésztési szempontból viszonylag nehezen kezelhető búza (*Triticum aestivum* L.) a humán táplálkozásban és gazdaságban betöltött fontos szerepe miatt került a középpontba és lett funkcionális genomikai ill. transzformációs kísérleteink célpontja.

Ha rövid történeti áttekintést teszünk, látható, hogy az első búza transzformációs eredmények (KLÖTI ET AL., 1993; ZHOU ET AL., 1993) – amelyek a gének protoplasztokban történő sikeres tranziens expresszióját és transzformált kalluszok előállítását jelentették – az 1990-es évek elején meglehetősen nehezen születtek meg. A genetikailag transzformált növények sorában a búza nem tartozik a könnyen kezelhető növényfajok közé, a gazdaságilag jelentős növények közül az utolsók között jelent meg (VASIL, 1992).

Akkor még úgy gondoltuk, az izolált protoplasztokba (PAUK ET AL., 1994) történő génbeépítés hozza majd meg a módszertani áttörést a búza genetikai transzformációjában. Mint azt ma már tudjuk, a búza transzformáció kulcsa a génbelövésre alapozott és az agrobaktérium (*Agrobacterium tumefaciens*) által közvetített módszer lett. A magyar transzformációs eredmények megalapozása viszont jóval korábbra tehető.

A hazai kutatók már a kezdeti transzformációs kísérletet megelőzően is meghatározó szerepet játszottak a búza sejt- és szövettenyésztési módszereinek kidolgozásában. Elegendő, ha DUDITS ÉS MTSAI (1975), HESZKY ÉS MESCH (1976) alapvetően meghatározó munkáira utalunk. Ezek a szomatikus és haploid szövettenyésztési eredmények alapvetően hozzájárultak ahhoz, hogy ma differenciálatlan, szomatikus és haploid szövettenyészetekből fertilis növényeket elő tudunk állítani. E nélkül a módszertani háttér nélkül nem lehetne napjainkban a búza genetikai transzformációjáról beszélni, mert módszertani háttérként feltétlen szükséges a steril tenyésztés.

A búza genetikai transzformációja jelentős kihívás elé állította a kutatókat. A legegyszerűbb módszernek a pollentömlőbe történő DNS-bevitel látszott (CHONG ET AL., 1998), de ez az eljárás nem hozott maradandóan nagy eredményeket. Az első publikációk a közvetlen génbevitel kezdeti sikereiről szóltak (LÖRZ ET AL. 1985). Idegen gének bejuttatására az egyszikűeknél hosszú ideig a protoplaszttechnika ígérkezett a leghatékonyabb módszernek. Az első búza transzformációs irodalmi adatok a polietilén-glikollal (PEG) közvetített génbevitelről számoltak be (VASIL ET AL. 1991, MARSAN ET AL. 1993). A közleményekből és saját tapasztalatokból kiderült, hogy a genetikai transzformációnak ez a módja rendkívül nehézkes és időigényesnek mondható. A protoplasztok izolálásán és a polietilén-glikol kezelésein túl az eljárást az is nehezítette, hogy a protoplaszt eredetű kalluszokból a fertilis növények felnevelhetősége csekély gyakoriságú, illetve genotípushoz kötött (Pauk et al., 1994). Mindezek ellenére figyelmet érdemel, hogy MÓROCZ ET AL. (1990) kukoricával született eredménye bizonyította, hogy a genetikai transzformációnak a protoplaszttechnika is hatékony eszköze lehet (OMIRULLEH ET AL., 1993; GOLOVKIN ET AL., 1993). A módszer jelentős hátránya, hogy a növények regenerációjára alkalmas szuszpenzió kialakítását feltételezi. Sajnos a búzasuszpenziók gyorsan elvesztik regenerálódási képességüket (DIMAIO ÉS SHILLITO, 1989), vagy olyan jelentős genetikai változást szenvednek, hogy gyakorlati célú felhasználásuk jelentősen lecsökken. A szegedi Gabonakutató Kht. is csaknem tíz évet fordított a protoplaszt-növény rendszer kialakítására. A növényregenerációra képes szuszpenzió kialakításával szerzett tapasztalatokat viszont később jól tudtuk alkalmazni a szuszpenziós tenyészetek génbelövésére.

Szövetek és sejtek elektroporációjával is jelentek meg közlemények egyes gabonafajok felhasználásával (LAURENSEN ET AL., 1994; XU ÉS LI, 1994), de búza esetében ez a módszer nem vezetett sikerre. Ismert egy olyan megoldás, ami a génbelövéshez hasonlóan szilárd hordozókkal (pl.: szilícium-karbid) juttatott be búzasejtekbe rekombináns DNS-t (SERIK ET AL., 1996; PETOLINO ET AL., 2000), de kiterjedtebb alkalmazását az első pozitív eredmények óta nem találjuk. Az eddig említett módszerek elterjedését bizonyos mértékig akadályozta a génbelövéses módszer biztos elterjedése.

Közismert, hogy a közvetett génbevitel az egyszikű fajoknál hosszú évekig nem jöhetett számításba annak a feltételezésnek köszönhetően, hogy az *Agrobacterium* csak kétszikű

növényeket képes fertőzni. HIEI ÉS MTSAI (1994) rizsben tett felfedezése óta azonban nagy változás állt be. Az első sikeres *Agrobacterium*-közvetített rizs transzformációs eredmények (HIEI ET AL., 1994; TINGAY ET AL., 1997) az 1990-es évek elejére tehetőek. A szegedi Gabonakutató Kht. is elkezdte a módszer adaptálását. Mindaddig azonban a SANFORD (1988) által szabadalmaztatott részecskebelövés elvén alapuló módszer bizonyult a leghatékonyabbnak búzában. Az eddigi eredmények túlnyomó többsége is ezzel a módszerrel született. A gének mesterséges bejuttatásában módszertani szempontból nagy jelentőségű volt a Cornell Egyetemen kifejlesztett részecskebelövő berendezés, ismert nevén a génpuska. Az első fertilis, transzgénikus búza növényeket ezzel a módszerrel hozták létre VASIL ET AL. (1992), valamint WEEKS ET AL. (1993). Két különböző eredetű (*Streptomyces hygroscopicus* – *bar*, *Escherichia coli* – *uidA*) mikrobiális gént jutattak be búzába, melyek jelenlétét és működését hitelesen bizonyították. Esetükben a tavaszi búza éretlen embrióinak génbelövésétől a transzgénikus növények virágzásáig mindössze 168 nap telt el, azaz kevesebb, mint fél év. A transzformációs eredményt NEHRA ET AL. (1994) és BECKER ET AL. (1994) is sikeresen megismételték, kisebb módszertani fejlesztéseket közölve.

Valamennyi idézett eredményben közös vonás, hogy *bar* herbicidrezisztenciát kódoló gént jutattak be búzába. Ezt a gént – mint marker gént – növénytranszformációkban ma már széles körben használják különböző foszfinotricin hatóanyagú szelekciós rendszerekben. Több kutatócsoport is megerősítette a transzformációs eredmények alapján, hogy az agronómiai szempontból fontos herbicidrezisztencia-bevitelnek nincs technikai akadály a búza esetében (VASIL ET AL., 1992; NEHRA ET AL., 1994; JORDAN ET AL., 1995; ALTPETER ET AL., 1996; WITRZENS ET AL., 1998).

A szegedi GK Kht. Biotechnológiai Osztályán, az utóbbi években sikerrel transzformáltuk a búzát különböző konstrukciókkal (FEHÉRNÉ ET AL. 2006). Mind a közvetlen biolisztikus, mind az *Agrobacterium*-közvetített génbeviteli módszert rutinszerűen alkalmaztuk. Eddig sikeresen transzformált (HALÁSZ ET AL., 2007) gének (ALR, ferritin, stb.) újabb irányra engednek minket áttérni, ez a rezisztencia kutatás funkcionális genomikai területe. Az alábbiakban ismertetett módszer lehetővé teszi a korábbi évekhez képest nagyszámú gén, génanalóg hatásának hatékony, célirányos elemzését.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Alapanyag, előkezelés

A transzformáció alapanyagául a mexikói származású (CIMMYT), de szövettenyésztési alkalmasságra hazánkban szelektált (FELFÖLDI ÉS PURNHAUSER 1992), CY-45 tavaszi búza genotípus éretlen – virágzástól számított 12-14 napos – embrióit használtuk.

Előkezelésként 5-10 napos tenyésztést alkalmaztunk 2 mg/l 2,4-D tartalmú kalluszindukciós MS táptalajon (MURASHIGE ÉS SKOOG 1962). A belövés előtti 4, illetve a belövés utáni 20 óras ozmotikus kezelés 63,75 g/l mannitollal kiegészített indukciós táptalajon történt.

Transzformációs vektorként a pAHC20 (CHRISTENSEN ET AL. 1992.) plazmidot használtuk, mely a *bar* herbicid-rezisztenciát kölcsönző szelekciós markergént tartalmazza, a kukorica ubiquitin-promóterének (Ubi-1) irányítása alatt.

Részecskebelövés

A plazmidvektorok rögzítése a mikrohordozó arany részecskék (1 µm) felületén ALTPETER ET AL. (1996) alapján történt: 5 µl mennyiségű plazmid-oldatot (1 µg/µl) adszorbeáltunk az arany részecskék (30 µl a 60 mg/ml törzs-szuszpenzióból) felületére. Az arany-DNS

szuszpenzió végkoncentrációját abszolút etanollal állítottuk be. A makrohordozók felületére 3,5 µl arany-DNS-etanol szuszpenziót vittünk fel, ezek az etanol elpárolgása után alkalmasak voltak a belövésre. A mikrohordozón rögzített plazmidvektorokat a BioRad® PDS-1000/He részecskebelövő segítségével juttattuk be a célszövetekbe (He-nyomás: 1100 psi).

Növényregeneráció, szelekció

A belövés után 20-24 órával a kallusokat indukciós táptalajra (MS, 2 mg/l 2,4-D, szacharóz helyett 3% maltóz, 5 µM CuSO₄ kiegészítéssel) helyeztük, és 10-14 napig, sötétben, 25-25°C-on tartottuk.

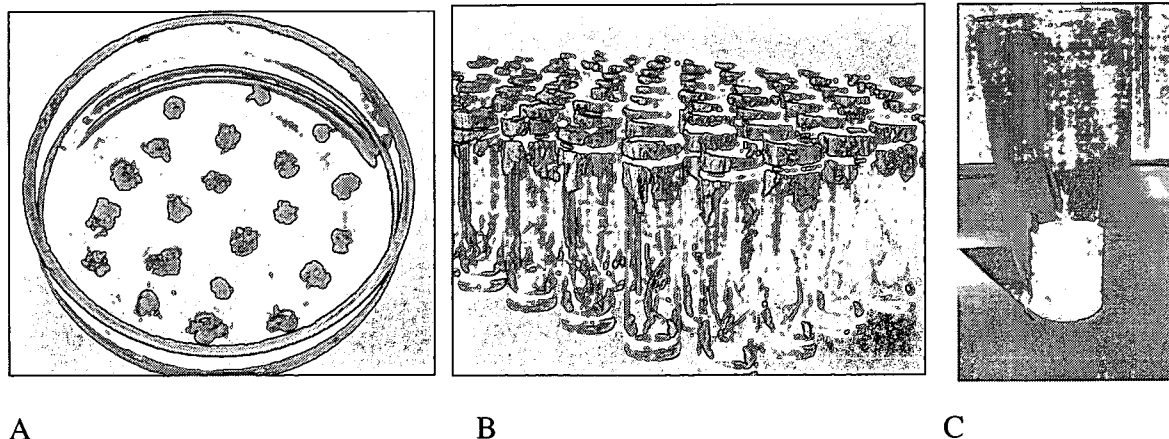
Ezt követően az inkubációt regeneráló táptalajon (hormonmentes MS, 3 mg/l PPT, 3% szacharóz, 5 µM CuSO₄ kiegészítéssel) 2 hétig, fényen, 24-25°C-on végeztük.

A regenerált növénykéket (>2 cm) gyökereztető táptalajra (½MS, 2% szacharóz, 5 mg/l PPT kiegészítéssel), egyedi üveg csövekbe helyeztük át (fény, 24-25°C).

A jól gyökeresedő növényeket talajba ültettük és üvegházi zárt rendszerben neveltük. Megfelelő akklimatizáció és fejlődés után a növényeket praktikus (herbicides permetezés Finale 14 SL-lel) és molekuláris módszerekkel (PCR) teszteltük. A *bar* génre specifikus primerekkel (5'CGAGACAAGCACGGTCAACTTC 3' - forward és 5'AAACCCACGTCATGCCAGTTC 3' reverse) PCR vizsgálattal bizonyítottuk a bevitt herbicid rezisztencia gén jelenlétét. Vizsgáljuk a bejuttatni kívánt gén expresszióját, integrálódását a genomba.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

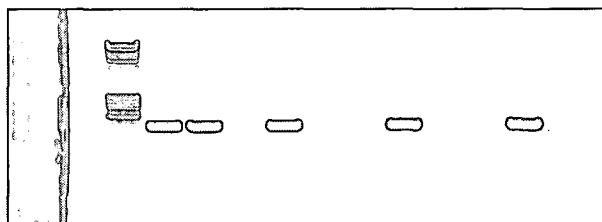
Kísérletünkben a fenti módszerrel 4000 db búza éretlen embriót transzformáltunk. A szelekció utolsó fázisában 707 növényt helyeztünk át üvegcsöbe. A növényregenerációt és szelekciót követően 58 db transzgénikus jelölt növényt ültettünk ki üvegházba, normál talajba (1. ábra). A növények megerősödését követően elvégeztük a PCR reakción alapuló DNS szintű vizsgálatot, mely szerint 19 db transzgénikus növényt állítottunk elő. A belőtt embriók izolálásától a meggyökeresedett transzgénikus-jelölt növények talajba ültetéséig kevesebb, mint 70 nap telt el. A belőtt embriókra vetített hatékonyság 0,475%-os volt. Ez nemzetközi összehasonlításban is jónak ill. átlagosnak mondható.



1. ábra: A szelekció (A) és növényregenerálás (B) folyamata
A talajba kiültetett növényeket (C) fóliatakarással adaptáltuk a további zárt rendszerű üvegházi neveléshez.

Előző kísérleteinkből és a nemzetközi kitekintés alapján látható, hogy a transzformáció hatékonyságát sok tényező befolyásolja. Ezek közül legfontosabb a bevitt gén és a transzformált búza genotípus. Az itt közölt és a jelen keretek között be nem mutatott kísérletek alapján az általunk rutinszerűen művelt génbeviteli eljárás 0,1-2,1%-os hatékonyságot mutatott (transzgenikus növény/transzformált búza embrió). A rendszer egyik kritikusként mondható pontja a növényregeneráció és az ezzel egyidejű szelekció. Ennek hatékonyságát nagyban befolyásolja az alapanyag növények kondíciója, fejlettsége, valamint lényeges az *in vitro* szelekcióra alkalmazott herbicid hatóanyag formája. Az itt bemutatott kísérletben PPT (DL-phosphinotricin, gluphosinate-ammonium) hatóanyagot adagoltunk a szelektív táptalajokba. Összhangban a nemzetközi eredményekkel, a PPT alkalmas a szelekcióra, de a korábban használt, ma már kereskedelmi forgalomban nem elérhető Bialaphos (gluphosinate-ammonium tripeptid) kevesebb megmenekült növényt és erőteljesebb, vigorosabb növekedést tett lehetővé.

A transzgenikus-jelölt növények herbicides permetezéssel történő tesztelésének eredménye teljes mértékben összhangban volt a specifikus PCR eredményeivel (2. ábra). Minden PCR pozitív növény túlélt a herbicides permetezést. A növények, melyekből DNS szinten nem volt kimutatható a *bar* gén jelenléte, a permetezést követő két héten belül elpusztultak.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

2. ábra: PCR pozitív (2.,3.,5.,8.,11.) és negatív (nincs jel) növények mintái

A megfelelő magasságban a specifikus primerekkel felszaporított DNS szakaszok (fehér csík) láthatók a pozitív növények mintáiban. 1: molekulásúly marker

Az általunk fentiekben bemutatott és alkalmazott módszert időbeni és a belőtt kalluszokra vetített hatékonysága alkalmassá teszi a funkcionális genomikai kutatásokra. A tesztelni kívánt gének száma még mindig nem vetekszik a tranziens expressziós rendszerekben tesztelt gének számával, de egy teljes munkaidőben alkalmazott laboráns képes lehet évi 4-5 gén bevitelére, már tesztelhető mennyiségű növény előállítására. Kísérletenként 15-50 független transzformáns vonal, már elegendő lehet a bevitt gén hatásának genetikai, élettani és biokémiai elemzéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki a NAP_BIO_06-NEWSEEDS pályázat támogatásáért.

IRODALOMJEGYZÉK

- Altpeter F., Vasil V., Srirastava V., Stöger E., Vasil I. K. (1996): Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep.*, 16 : 12-17.
- Becker D., Brettschneider R., Lörz H. (1994): Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal*, 5: 299-307.
- Chong K., Bao S., Xu T., Tan K., Liang T., Zeng J., Huang H., Xu J., Xu Z. (1998): Functional analysis of the *ver* gene using antisense transgenic wheat. *Physiol. Plantarum*, 102: 87-92.

- Christensen AH, Sherrock RA, Quail P (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, 18: 675-689.
- DiMaio, J. J. Shillito, R. D. (1989): Cryopreservation technology for plant cell cultures. *Journal of Tissue Culture Methods*, 12: 163-169.
- Dudits D, Német G, Haydu Z (1975): Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. *Canadian Journal of Botany* 53: 957-963.
- Fehérné JE, Cseuz L, Horváth V.G, Mai A, Secenji M, Sass L, Hideg É, Vass I, Dudits D, Pauk J (2006) A búzába történő génbeépítés módszerei és hazai géntechnológiai eredmények a búza szárazságtűrésének javítására. In: Dudits D: A búza nemesbítésének tudománya 99-110 MTA Szegedi Biológiai Központ-Winter Fair, 2006.
- Felföldi, K., Purnhuaser, L. (1992): Induction of regenerating callus from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cer. Res. Comm.*, 20: 273-277.
- Golovkin M. V., Ábrahám M., Mórocz S., Bottka S., Fehér A., Dudits D. (1993): Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplast. *Plant Sci. Limerick*, 90: 41-52.
- Halász Á., Horváth-Szancsics E., Nagy-Gasztonyi M., Pauk J., Hajós Gy. (2007): Traceability of enzyme activities and immune reactivity of albumin-globulin proteins of wide-range herbicide resistant transgenic wheat lines. *Cer. Res. Comm.* 35: 1405-1413.
- Heszky L., Mesch J. (1976): Anther culture investigation in cereal gene bank collection. *Z. Pflanzenzüchtung*, 77: 187-197.
- Hiei Y., Ohta S., Komori T., Kumashiro T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Jordan M.C., Qureshi J.A., Chibbar R.N., Kartha K.K., Rodrigue D., Fromm M.E., (1995): Genetic engineering of wheat for glyphosate tolerance. Abstracts Conference on Value-Added Cereals Through Biotechnology, Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada, Saskatoon, SK, Canada, pp.1-95.
- Klöti, A.; Iglesias, V.A.; Wijn, J.; Burkhardt, P.K.; Datta, S.K. and Potrykus, I. (1993). Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos. *Plant Cell Rep.*, 12:671-675.
- Laursen C. N., Krzyzek R. A., Flick C. E., Anderson P. C., Spencer T. M. (1994): Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol. Biol.*, 24: 55-61.
- Lörz H., Baker B., Schell J. (1985): Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Genet.*, 199: 178-182.
- Marsan P.A., Lupotto E., Locatelli F., Qiao Y..M., Cattaneo M. (1993): Analysis of stable events of transformation in wheat via PEG-mediated DNA uptake into protoplasts. *Plant Science*, 93: 85-94.
- Mórocz S., Donn G., Németh J., Dudits D. (1990): An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 721-726.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nehra N.S., Chibbar R.N., Leung N., Caswell K., Mailard L., Steinhauser L., Baga M.,-Kartha K.K. (1994): Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissue following microprojectile bombardment with distinct gene constructs. *Plant J.*, 5: 285-297.

- Omirulleh S., Ábrahám M., Golovkin M., Stefanov I., Karabaev M. K., Mustardy L., Mórocz S., Dudits D. (1993): Activity of the chimeric promoter with the doubled CaMV35S enhancer element in protoplast derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.*, 21:415-428.
- Pauk J., Kertész Z., Jenes B., Purnhauser L., Manninen O., Pulli S., Dudits D. (1994): Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 38: 1-10.
- Pauk J., Kertész Z., Jenes B., Purnhauser L., Manninen O., Pulli S., Dudits D. (1994): Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 38: 1-10.
- Petolino J.F., Hopkins N. L., Kosegi B. D., Skokut M. (2000): Whiesker-mediated transformation of embryogenic callus of maize. *Plant Cell Rep.*, 19: 781-786.
- Sanford J.C. (1988): The biolistic process - a new concept in gene transfer and biological delivery. *Trends Biotechnol.*, 6: 229-302.
- Serik O., Ainur I., Murat K., Tetsuo M., Masaki I. (1996): Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) mature embryos. *Plant Cell Rep.*, 16: 133-136.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* – mediated barley transformation. *Plant J.*, 11: 1369- 1376.
- Vasil V., Brown S.M., Re D., Fromm M.E., Vasil I.K. (1991): Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology*, 9: 743-747.
- Vasil V., Castillo A., Fromm M., Vasil I. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-proprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10: 667-674.
- Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E. (1993): Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.*, 102: 1077-1084.
- Xu, Y. Li, B. (1994): Fertile transgenic indica rice plants obtained by electroporation of seed embryo cells. *Plant Cell Rep.*, 13: 237-242.
- Witrzens B., Brettel R.I.S., Murray F.R., McElroy D., Li Z., Dennis E.S., (1998): Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment. *Aust J Plant Physiol.*, 25: 39-44.
- Zhou, H.; Stiff, C.M. and Konzak, C.F. (1993). Stably transformed callus of wheat by electroporation- induced direct gene transfer. *Plant Cell Rep.*, 12: 612-616.