

АНАЛІЗ УСПАДКУВАННЯ ТРАНСГЕНІВ У ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ МЕТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ

Останніми роками у провідних біотехнологічних центрах світу інтенсивно проводяться роботи з модифікації ядерного геному сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці, із застосуванням методів генної інженерії [1, 2]. Під час створення трансгенних рослин і їх впровадження в сільське господарство найбільш важливим моментом є досягнення високого і стабільного рівня експресії перенесених цільових генів як серед вихідних трансформантів та їхніх нащадків від самозапилення, так і у гібридів від їх схрещування. Стабільне успадкування трансгенів є необхідною передумовою для застосування генно-інженерних ліній у подальшому селекційному процесі. Дослідження стабільності експресії та успадкування чужорідних генів у геномі трансгенних рослин показали, що, як правило, вони успадковуються за класичними законами Менделя як домінантні мутації [3–6]. Однак до теперішнього часу накопичено досить багато прикладів відхилень від менделівського успадкування, зумовлених делеціями або мутаціями введеної ДНК [7, 8], інактивацією трансгена [9], а також утворенням химер, тобто організмів, що складаються з генетично неоднорідних клітин [10]. Втрата експресії трансгенів, відома як «gene silencing», є небажаним явищем у ході створення трансгенних рослин. Незважаючи на інтенсивні дослідження цього явища у багатьох біотехнологічних центрах, його причини і молекулярно-генетичні механізми все ще залишаються до кінця не з'ясованими.

У ядерний геном рослинних клітин можуть вбудовуватися від однієї до декількох копій Т-ДНК. На підставі результатів аналізу популяцій вихідних трансгенних рослин встановлено, що приблизно у 40–60 % випадків виявляються рослини з однією вставкою трансгена, в інших випадках – з множинними Т-ДНК інсерціями [4, 11]. Відомо, що вбудовування множинних тісно зчеплених копій гетерологічних генів часто спостерігається за прямого перенесення генів у

рослинну клітину [12]. Досить високий відсоток рослин із тандемними повторами в одному локусі реєструється і за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [13]. Наявність множинних копій у складі чужорідної інсерції може впливати на рівень і стабільність експресії перенесених генів. Відзначено негативну кореляцію між рівнем експресії трансгенів і числом їх копій у геномі [14].

Відомо, що вбудовування в рослинний геном однієї копії Т-ДНК, як правило, пов'язане зі стабільним рівнем експресії перенесених генів [15]. Такі рослини є цінними з точки зору їх використання в якості вихідного матеріалу для подальшого селекційного відбору та створення сортів. У зв'язку з цим метою нашої роботи було проаналізувати стабільність експресії та успадкування трансгенів у отриманих нами методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генетично-модифікованих рослин пшениці, які містять гени метаболізму проліну.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували сучасний високоврожайний сорт м'якої пшениці Зимоярка, який характеризується достатньо високим морфогенним потенціалом *in vitro*. Для трансформації використовували калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили згідно з описаною методикою [16] з використанням штаму AGLO та двох векторних конструкцій, одна з яких містить ген синтезу, а друга – катаболізму проліну. Векторна конструкція рВі2Е містить дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*), отриманий на основі гена *Arabidopsis* (*dsRNA suppressor ProDHI*), а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Дру-

га конструкція містить бінарний вектор рВи-ОАТ з цільовим геном – орнітінамінотрансферази *Medicago truncatula*, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Обидві конструкції люб'язно надані д.б.н. А.В. Кочетовим (Інститут цитології і генетики СВ РАН, м. Новосибірськ). Трансгенний статус регенерантів підтверджували методом ПЛР [16]. Лінії Зимоярка – 1, 11, 34, 61 отримані за трансформації векторною конструкцією рВи2Е, а лінії Зимоярка 114, 129, 154, 169 – за трансформації векторною конструкцією рВи-ОАТ.

Насіння, отримане в результаті самозапилення створених ліній, стерилізували і на добу замочували у стерильній воді для ініціації проростання. Після того видаляли насінневу оболонку, залишаючи лише зародок, і пророщували в умовах освітлення на безгормональному середовищі МС з додаванням канаміцину, виконували 2 пацажі по 10 діб.

Результати та обговорення

Нами проведено аналіз успадкування маркерного гена *nptII*, що зумовлює стійкість до канаміцину, у нащадків трансформантів, отриманих від самозапилення. Генетичний аналіз успадкування гена *nptII* проводили за фенотиповим розщепленням проростків в умовах впливу селективного агента канаміцину у концентрації 100 мг/л.

Результати сегрегації в потомствах 8 рослин-трансформантів за фенотипом проростків, вирощених на середовищі з канаміцином, наведені в таблиці 1. Як гіпотезу взято припущення, що в геном вбудована одинична інсерція, і тому під час вирощування проростків на селективно-

му середовищі повинна мати місце моногенна схема сегрегації досліджуваної ознаки. Зелений проросток (присутність інсерції) вказує на те, що у ньому є фрагмент ДНК, який несе стійкість до антибіотика канаміцину, тоді як хлоротичний проросток (відсутність інерції, або «мовчання» маркерного гена) вказує на відсутність стійкості до канаміцину.

Як видно з даних, представлених у табл. 1, моногенний тип сегрегації фенотипів за стійкістю до канаміцину виявлено у чотирьох з восьми досліджених ліній (Зимоярка – 1, 61, 154, 169).

Щодо цих форм можна зробити висновок, що у батьківських рослинах відбулася одинична інсерція в одну з хромосом пшениці, й у потомстві спостерігається моногенна сегрегація фенотипів. У лінії Зимоярка-129 спостерігалася відсутність стійкості до канаміцину у всіх проростків без винятку, що, можливо, зумовлено явищем сайленсінгу. Водночас відомо, що відсутність стійкості до антибіотика канаміцину у нащадків трансформантів може бути пов'язана з низкою причин, серед яких могли бути такі, як багатокопійність Т-ДНК інсерцій, химерність рослинних тканин у вихідних трансформантів, мікроделеції і мутації за районами Т-ДНК, вбудовування інсерцій у гіперметиловані ділянки геному і т.ін. [5, 17–19]. У рослин ліній Зимоярка – 11, 34 та 114 розщеплення за ознакою стійкості до селективного агента не спостерігали, що говорить про вбудовування більш ніж однієї копії трансгена.

Наявність маркерного гена *nptII* у стійких до канаміцину рослин Т₁ ліній Зимоярка 1 та 154 була перевірена і підтверджена методом ПЛР аналізу ($\chi^2 < 3,84$). Додатково зразки, у яких підтверджено наявність гена *nptII*, перевіряли

Таблиця 1

Аналіз фенотипового розщеплення рослин пшениці покоління Т₁

Лінія	Висаджено насіння, шт.	Отримано проростків, шт.	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	χ^2 *
			Км ⁺	Км ⁻		
Зимоярка-1	50	48	38	10	3:1	0,44
Зимоярка-11	50	49	49	–	відсутнє	–
Зимоярка-34	50	47	47	–	відсутнє	–
Зимоярка-61	50	50	35	15	3:1	0,66
Зимоярка-114	50	43	43	–	відсутнє	–
Зимоярка-129	50	42	–	42	–	–
Зимоярка-154	50	47	36	11	3:1	0,06
Зимоярка-169	50	48	32	16	3:1	1,77
С. Зимоярка (контроль)	50	49	–	49	відсутнє	–

Примітки: Відмінності достовірні з імовірністю $P=0,95$; $\chi^2_{st} = 3,841$.

на присутність гена *pdh* за наявності екзона 1 у рослин із конструкцією рВі2Е або гена орнітинамінотрансферази у рослин із конструкцією рВі-ОАТ. Результати аналізу засвідчили, що зазначені гени були присутні в проаналізованих рослинах у співвідношенні 3:1 ($\chi^2 < 3,84$), що свідчить про те, що обидва трансгени були інтегровані в одному локусі. З кожної лінії було відібрано по 10 рослин, у геномі яких були наявні маркерний та цільовий гени, і шляхом самозапилення було отримано друге насінне покоління. Під час аналізу отриманих рослин T_2 виявлено гомозиготні лінії за ознакою стійкості до канаміцину (табл. 2).

Оскільки в аналізовану групу рослин були включені трансформанти, у яких співвідношення Km^+ – і Km^- нащадків в умовах селективного середовища відповідало 3:1, то серед рослин T_2 слід було очікувати появи або тільки Km -стійких особин, або розщеплення $3Km^+ : 1Km^-$. Якщо канаміцин-стійка рослина першого покоління була гомозиготою за трансгенами (гена *nptII*), то всі її нащадки в умовах селективного середовища повинні проявляти Km -стійкий фенотип. Якщо вихідна рослина була гемізиготою за трансгенами,

то за наявності в геномі однієї інсерції Т-ДНК розщеплення серед нащадків за Km^+ і Km^- фенотипами повинно відповідати 3:1. Із результатів, представлених у таблиці 2, видно, що майже всі проаналізовані трансгенні рослини пшениці, віднесені до групи трансформантів з однією інсерцією ТДНК на геном, в умовах селективного середовища у другому поколінні від самозапилення проявляли Km -стійкий фенотип, що відповідало гомозиготі за проаналізованим геном (*nptII*⁺/*nptII*⁺), або давали розщеплення 3:1 (*nptII*⁺/*nptII*⁻). Саме такі гомозиготні за геном *nptII* рослини були виділені в результаті проведеного аналізу: лінії Зимоярка-1/2, Зимоярка-1/6, Зимоярка-1/8 за трансформації конструкцією рВі2Е та 4 лінії – Зимоярка-154/2, Зимоярка-154/5, Зимоярка-154/7, Зимоярка-154/9 за трансформації конструкцією рВі-ОАТ.

Вияток склали три зразки Зимоярка-1/7, Зимоярка-154/8 та Зимоярка-154/10, у яких спостерігалася повна втрата експресії трансгена при самозапиленні моноінсерційних рослин. Феноменологічні випадки «замовкання» чужорідних генів за *Agrobacterium*-опосередкованої тран-

Таблиця 2

Аналіз фенотипового розщеплення рослин пшениці покоління T_2

Лінія	Висаджено насіння, шт.	Отримано проростків, шт.	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	χ^2 *
			Km^+	Km^-		
Зимоярка-1/1	50	49	39	10	3:1	0,76
Зимоярка-1/2	50	48	48	–	відсутнє	–
Зимоярка-1/3	50	50	41	9	3:1	1,3
Зимоярка-1/4	50	50	36	14	3:1	0,24
Зимоярка-1/5	50	49	34	15	3:1	0,72
Зимоярка-1/6	50	50	50	–	відсутнє	–
Зимоярка-1/7	50	48	–	48	–	–
Зимоярка-1/8	50	50	50	–	відсутнє	–
Зимоярка-1/9	50	50	42	8	3:1	2,16
Зимоярка-1/10	50	49	38	11	3:1	0,22
Зимоярка-154/1	50	50	36	14	3:1	0,30
Зимоярка-154/2	50	48	48	–	відсутнє	–
Зимоярка-154/3	50	47	30	17	3:1	2,52
Зимоярка-154/4	50	49	35	14	3:1	0,33
Зимоярка-154/5	50	49	49	–	відсутнє	–
Зимоярка-154/6	50	47	32	15	3:1	–
Зимоярка-154/7	50	50	50	–	відсутнє	–
Зимоярка-154/8	50	48	–	48	–	–
Зимоярка-154/9	50	50	50	–	відсутнє	–
Зимоярка-154/10	50	49	–	49	–	–
С.Зимоярка (контроль)	50	49	–	49	відсутнє	–

Примітки: *Відмінності достовірні з імовірністю $P=0,95$; $\chi^2_{st} = 3,841$.

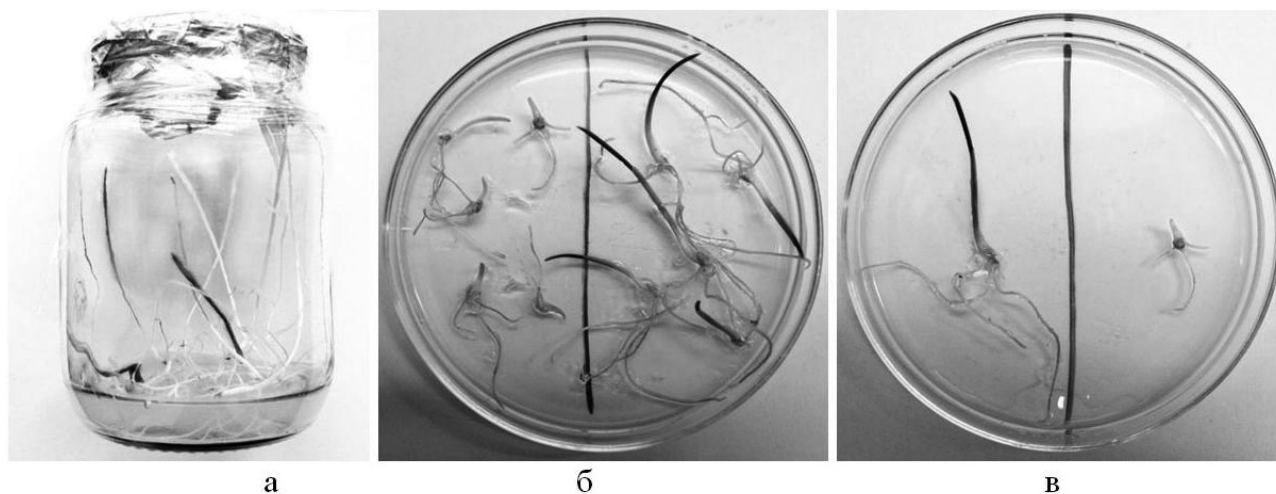


Рис. Фенотиповий прояв ознак стійкості до стресових чинників у трансгенних рослин пшениці: а – канаміцин-стійкі та нестійкі рослини пшениці; б – ріст нетрансгенних контрольних (сорт Зимоярка) та трансгенних рослин (лінія Зимоярка -1/6) на селективному середовищі з 0,8 М маніту; в – ріст зрілих зародків на середовищі з комплексним стресовим фактором: 0,8 М маніту + 100 мг/л канаміцину (лінія Зимоярка-154/5)

сформації серед нащадків першого покоління генетично модифікованих форм описані для різних видів рослин: тютюну, петунії, арабідопсису, рису та ін. [5, 11, 12]. Відомо, що у рослин тютюну частота інактивування трансгенів змінювалася від 8 % до 36 %, а у *A. thaliana* від 10 % до 50 % [10]. Це також може бути пов'язано з можливою химерністю рослинних тканин у вихідних трансгенних формах [10]. Частота інактивзації може істотно зростати, якщо до складу генетичної конструкції включені тандемні копії генів як у прямій, так і у зворотній орієнтації [5].

Фенотипово стійкі до антибіотика, гомозиготні за розчепленням рослини T_2 були перевірені методом ПЛР аналізу на наявність генів *nptII*, *pdh* та *oat*. Результати аналізу засвідчили стабільний характер успадкування інтегрованих у геном пшениці маркерного та цільових генів.

Оскільки генетична трансформація пшениці з використанням генів метаболізму L-проліну може призводити до підвищення рівня стійкості трансгенних рослин до абіотичних стресів [20], то для підтвердження активності цільових генів зрілі зародки з насіння проаналізованих форм висаджували на селективне середовище з 0,8 М маніту для визначення рівня їх толерантності до водного дефіциту (рис. б). Показано, що трансгенні рослини ростуть на селективному середо-

вищі з манітом швидше, зберігаючи яскраво-зелене забарвлення, на відміну від контрольних, які значно відставали в рості, мали блідо-зелене забарвлення і згодом гинули. Додатково трансгенні рослини поміщали на середовище з комплексом стресових чинників, яке містило 0,8 М маніту та 100 мг/л канаміцину, що дало змогу чітко ідентифікувати експресію трансгенів за фенотиповим проявом.

Висновки

Проведений генетичний аналіз успадкування трансгенів в отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генетично модифікованих рослин пшениці, що містять гени метаболізму проліну. Більшість проаналізованих рослин у поколінні T_1 - T_2 як з конструкцією pVi2E, так і з конструкцією pVi-OAT зберігали стійкість до селективного агента – канаміцину, що свідчить про успадкування і експресію маркерного гена. Методом ПЛР у стійких до канаміцину рослин T_1 лінії Зимоярка 1 та 154 була підтверджена наявність цільових генів у співвідношенні 3:1, що свідчить про те, що трансгени були інтегровані в одному локусі геному пшениці і стабільно успадковуються у насінневих поколіннях. У поколінні T_2 виділено гомозиготні рослини, у яких активні маркерний і цільові гени.

ЛІТЕРАТУРА

1. El-Mangoury K., Abdroub R., Yasien M., Fahmy A. Optimization of a transformation system for three Egyptian wheat cultivars using immature embryo-derived callus via microprojectile bombardment // Arab. J. Biotech. – 2006. – 9, № 1. – P. 175–188.
2. Xia G., Li Z., He C., Chen H., Richard B. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Physiol. Sin. – 1999. – 25. – P. 22–28.
3. Peng J., Wen F., Lister R., Hodges T. Inheritance of gusA and neo genes in transgenic rice // Plant Mol Biol. – 1995. – 27, № 1. – P. 91–104.
4. Budar F., Thia-Toong L., Van Montagu M., Hernalsteens J.-P. *Agrobacterium*–mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single mendelian factor // Genetics. – 1986. – 114. – P. 303–313.
5. Дейнеко Е. В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений (на примере *Nicotiana tabacum* L.): дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.15. – Новосибирск, 2004. – 198 с.
6. Zhang Y., Yang B., Chen S. Inheritance analysis of herbicide-resistant transgenic soybean lines // Acta Genetica Sinica. – 2006. – 33, № 12. – P. 1105–1111.
7. Labra M., Savini C., Bracale M. et al. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Reports. – 2001. – 20 – P. 325–330.
8. Kim C.H. Frequent occurrence of transgene deletion in transgenic plants // Mol. Cells. – 1998. – 8. – P. 705–708.
9. Курочкина С.Н. Генетическая трансформация растений, процессы рекомбинации и регуляции экспрессии генов у трансгенных растений // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1998. – № 4. – С. 3–12.
10. Dong J., McHughen A. Transgenic Flax Plants from agrobacterium-mediated Transformation: Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants // Plant Sci. – 1993. – 91. – P. 139–148.
11. Sallaud C., Lorieux M., Roumen E., Tharreau D., Berruyer R., Svestasrani P., Garsmeur O., Ghesquiere A., Notteghem J. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – 106. – P. 794–803.
12. Vain P., James V., Worland B., Snape J. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – 105. – P. 878–889.
13. Kumar S., Fladung M. Controlling transgene integration in plants // Trends Plant Sci. – 2001. – N 6. – P. 155–159.
14. Wang Z., Shu Q., Ye G., Cui H., Wu D., Altosaar I., Xia Y. Genetic analysis of resistance of Bt rice to stripe stem borer (*Chilo suppressalis*) // Euphytica. – 2002. – 123. – P. 379–386.
15. Matzke A.J.M., Matzke M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes // Current Opinion in Plant Biology. – 1998. – 1, N 2. – P. 142–148.
16. Бавол А.В. Воронова С.С., Дубровна О.В. Оптимізація *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації калюсних культур пшениці // Физиология растений и генетика. – 2015. – 47, № 1. – С. 58–65.
17. Хадеева Н.В., Яковлева Е.Ю. Анализ наследования маркерного и целевого генов в семенном и вегетативном потомстве трансгенных растений табака с геном ингибитора сериновых протеиназ грачиhi // Генетика. – 2010. – 46, № 1. – С. 58–65.
18. Flachowsky H., Riedel M., Reim S., Hanke V. Evaluation of the Uniformity and Stability of T-DNA Integration and Gene Expression in Transgenic Apple Plants // Electr. J. Biotechnol. – 2008. – 11. – P. 1–15.
19. Costa M., Otoni W., Moore G. An Evaluation of Factors Affecting the Efficiency of *Agrobacterium*–Mediated Transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and Production of Transgenic Plants Containing Carotenoid Biosynthetic Genes // Plant Cell Rep. – 2002. – 21. – P. 365–373.
20. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология растений и генетика. – 2013. – 45, № 6. – С. 488–500.

DUBROVNA O.V., BAVOL A.V., VORONOVA S.S., GONCHARUK O.N.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

ANALYSIS OF THE TRANSGENES INHERITANCE IN THE GENETICALLY MODIFIED WHEAT PLANTS WITH PROLINE METABOLISM GENES

Aim. Analysis of the marker and target genes inheritance in the progeny of transgenic wheat plants with proline metabolism genes. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*, genetic and statistical analysis. **Results.** Progeny segregation analysis indicated that the transgenes were integrated into the same locus of the wheat genome, resulting in a 3:1 segregation ratio of the transgenes. Expression analysis of all transgenes revealed that the transgenes were expressed in all generations (T0-T2). **Conclusions.** Homozygous progeny plants expressing the marker and target genes were obtained in the T2 generation of lines Zymoyarka 1 and Zymoyarka 154.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, inheritance of transgenes.