

УДК 561.143.6

ОСОБЛИВОСТІ МЕЙОЗУ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ IN PLANTA

О.М. ГОНЧАРУК, О.В. ДУБРОВНА, А.В. БАВОЛ, С.С. ВОРОНОВА, І.І. ЛЯЛЬКО

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net*

Досліджено перебіг мейозу в генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації сорту Зимоярка методом in planta. Виявлено, що трансгенні форми характеризуються більшою частотою порушень мейозу порівняно з нетрансгенними рослинами. У результаті порівняльного аналізу перебігу мейозу встановлено, що у трансгенних ліній, отриманих за використання штаму AGLO і векторної конструкції pVi2E, відсоток клітин із порушеннями на стадії метафази I був значно нижчим, а мейотичний індекс відповідно вищим, ніж у ліній, отриманих за використання штаму AGLO і векторної конструкції pVi-OAT. Визначено, що кількість клітин із порушеннями мейозу найбільша у трансгенних рослин ліній зі зниженою фертильністю пилку і низькою насінневою продуктивністю.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація in planta, мейоз.

В останні десятиліття широко використовують різноманітні підходи для створення генетично модифікованих рослин пшениці, одним з яких є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, що дає змогу вводити в геном реципієнта обмежене число копій генів і передавати відносно великі генетичні конструкції з мінімальними перебудовами в кодувальних послідовностях генів, що переносяться [19, 30].

Одним із методів перенесення агробактеріальної Т-ДНК в однодольні рослини є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація in planta, що дає змогу уникати культивування in vitro та можливої соматональної мінливості [14]. Цей метод успішно використовують для різних злакових культур, у тому числі й пшениці [2, 3, 19, 28, 31]. Встановлено, що частота трансформації пшениці в такому разі може бути вищою порівняно з іншими методами генетичної трансформації [31].

За *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин можливі генетичні та епігенетичні зміни геному [4, 22, 26]. Спектр описаних у літературі Т-ДНК-індукованих мутацій доволі широкий — від точкових мутацій до значних хромосомних перебудов і навіть змін рівня плоїдності [20, 23, 24, 29]. Крім того, стреси, пов'язані з різними аспектами трансформації рослин, зокрема такими, як інфікування *Agrobacterium*, також можуть спричинювати різноманітні зміни в геномі [18].

Встановлено, що за трансгенезу інсерція Т-ДНК у функціонально значущі ділянки геному здатна негативно впливати на мейоз і фер-

тільність пилку [12, 21, 27], позначатись на репродуктивній здатності рослин-трансформантів [11, 25]. Описано мутації, що відбуваються на різних стадіях мікро- й макроспорогенезу, а також гаметогенезу [12]. Порухення нормального перебігу мейозу в рослин виявляються порушенням синапсису, заміною першого мейотичного поділу на мітотичний, передчасним цитокінезом, зміною конденсації хроматину, злипанням і фрагментацією хромосом, нездатністю хромосом до кон'югації, утворенням різної кількості унівалентів, неодноточасним і нерівномірним розходженням хромосом до полюсів, формуванням діад і тетрад із мікроядрами, появою поліад [6, 7, 11, 25]. Спостерігаються також аномалії мейозу, пов'язані з апаратом веретена поділу [11]. Порушення перебігу мейозу призводить до зниження насінневої продуктивності генетично модифікованих рослин. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження особливостей перебігу мейозу в генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta*.

Методика

Досліджено рослини м'якої пшениці сорту Зимоярка (оригінатор — Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили згідно з описаними методиками [2, 3] з використанням штаму AGLO та двох векторних конструкцій. Векторна конструкція pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*), отриманим на основі гена *Arabidopsis* (*ds-RNA suppressor Pro-DHI*), а також селективним геном неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*, друга конструкція — з бінарним вектором pBi-OAT із цільовим геном орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula* і селективним геном неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Обидві конструкції люб'язно надані д-ром біол. наук О.В. Кочетовим (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук, Новосибірськ).

Трансгенний статус рослин підтверджено методом ПЛР [2, 3]. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду. До початку цвітіння здійснювали кастрацію колоса за стандартною методикою. На кожен колос одягали індивідуальний ізольатор із пергаментного паперу й проводили етикетування. Інокуляцію суспензією клітин агробактерій виконували через 3 доби після кастрації. Агробактеріальну суспензію наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного піпет-дозатора. Після повного висихання розчину їх запилювали пилком, отриманим з інтактного колоса тієї самої рослини.

Матеріалом досліджень були три трансгенні лінії пшениці сорту Зимоярка (Зимоярка 32р, 74р, 86р), отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації за використання векторної конструкції pBi2E, і три лінії (Зимоярка 93р, 126р, 134р), отримані за використання векторної конструкції pBi-OAT. Усі досліджені рослини в поколінні T₀ мали нормальний хромосомний набір ($2n = 6x = 42$) і були фертильними.

Цитологічний аналіз мейозу проводили на материнських клітинах пилку (МКП). Для кожного варіанта брали по 4—5 колосів, які ще не вийшли з листкової піхви, щоб виявити усі стадії мікроспорогенезу. Фіксували їх в суміші оцтової кислоти та етанолу (1 : 3). Після фіксації пиляки відмивали кілька разів у дистильованій воді й фарбували 2 %-м ацетокарміном. Тимчасові давлені препарати готували за загальноприй-

нятою методикою [9]. Аналізували всі пиляки, МКП яких знаходилися на стадіях мейозу (профаза 1, метафази 1, 2, ана-телофази 1, 2, формування тетрад). У діакінезі й метафазі мейозу 1 (M1) вивчали по 15–20 чітких метафазних пластинок, на стадіях ана-телофаз — не менш як 50 клітин на колос. На стадії T2 аналізували по 200–250 тетрад на одну рослину, визначали мейотичний індекс (кількість МКП без порушень на цій стадії). Контролем слугували рослини вихідного сорту Зимоярка. Препарати аналізували під мікроскопом Amplival («Zeiss») зі збільшеннями 15×40 і 15×100 . Фертильність пилку визначали за стандартною методикою [9].

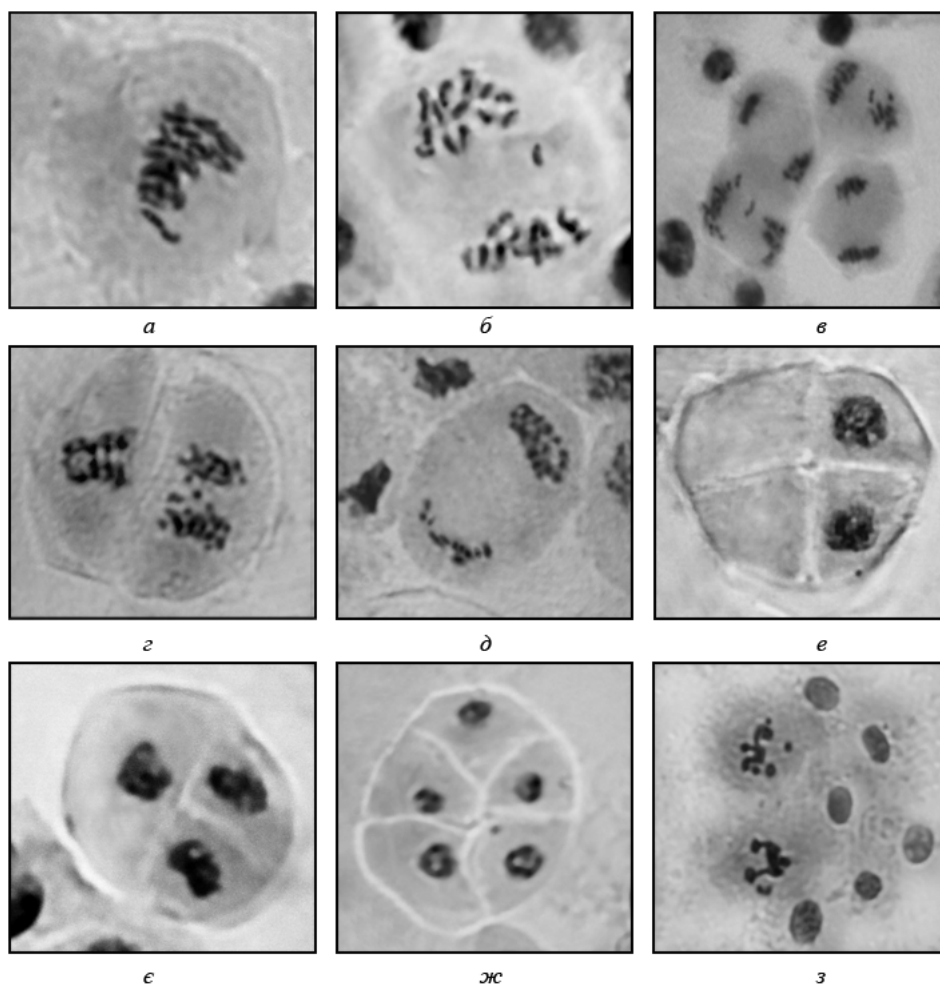
Результати та обговорення

Цитологічний аналіз мікроспорогенезу в контрольних рослин сорту Зимоярка показав, що мейоз відбувався практично без порушень. Усі рослини мали стандартний хромосомний набір ($2n = 6x = 42$). Хромосомні асоціації в M1 представлені в основному закритими бівалентами (21^{II}_3). Виявлено лише дві клітини з відкритими бівалентами та одну з унівалентами ($20^{II}_3 + 1^{II}_B$; $20^{II} + 2^I$), що відповідає нормальному перебігу мейозу (табл. 1). Усі біваленти розміщені на екваторі метафазної пластинки мікроспороцитів, а їх центромери орієнтовані до полюсів веретена поділу. На стадіях ана-телофаз обох мейотичних поділів виявляли фрагменти із частотою 1,7 %. Нормальні тетради формувались у гніздах пиляків синхронно, клітини з мікроядрами траплялися з частотою 1,4 %. Отже, отримані дані підтвердили нормальний перебіг мейозу в контрольних рослин та їх цитологічну стабільність.

Під час мікроспорогенезу в генетично модифікованих рослин спостерігали за утворенням бівалентів у діакінезі, в M1 аналізували характер кон'югації хромосом, відмічали наявність відкритих бівалентів, уній мультівалентів. Результати аналізу на стадії метафази 1 у генетично модифікованих ліній наведено в табл. 1. В усіх зразках утворювались бівалентні асоціації хромосом (21^{II}_3 ; $20^{II}_3 + 1^{II}_B$ або $19^{II}_3 + 2^{II}_B$). При цьому в усіх ліній переважали закриті біваленти, що свідчить про високу інтенсивність синапсису гомологічних хромосом. Найбільша кількість закритих бівалентів (75,5 %) була у лінії Зимоярка 32р, найменша (55,1 %) — у лінії Зимоярка 126р. У каріотипах усіх ліній виявлено по 1–2 відкритих біваленти й лише у лінії Зимоярка 126р — клітини з трьома відкритими бівалентами ($18^{II}_3 + 3^{II}_B$). Поява відкритих бівалентів вказує на ослаблення синапсису гомологів, проте десинапсис не чинив негативного впливу на перебіг мейозу. З часом мейоз стабілізувався і кількість відкритих бівалентів зменшувалась [6, 10]. Мультівалентних асоціацій хромосом ми не виявили.

Основним типом порушень на стадії M1 є наявність унівалентних хромосом (рисунок, *a*), що підтверджує відсутність кон'югації (асинапсис) між гомологічними хромосомами й призводить до аномалій мейозу на подальших стадіях [8]. Відсутність кон'югації та утворення різних кількостей унівалентів зумовлені мутаціями генів, які контролюють синапсис [13].

Ми спостерігали переважно клітини з двома унівалентами ($20^{II} + 2^I$), лише в лінії Зимоярка 126р траплялись окремі клітини з трьома ($20^{II} + 3^I$) унівалентними хромосомами (6,1 %), що свідчить про наявність у цьому каріотипі анеуплоїдних клітин. Однією з причин виникнення таких клітин може бути цитоміксис [12]. Як правило, унівалентні хромосоми розміщувались за межами метафазної пластинки, не відходили до по-



Порушення мейозу в клітинах генетично модифікованих рослин пшениці:

а — клітина з унівалентом; *б* — анафаза I з викидом хромосоми; *в* — клітини з викидом і відстаючою хромосомою; *г* — асинхронний поділ; *д* — асиметричний поділ; *е* — тетрада з двома відсутніми мікроспорами; *е* — триада; *ж* — пентада; *з* — клампінг хромосом

люсів, залишалися в цитоплазмі, а на стадії телофази утворювали мікроядра. Клітин з унівалентами було від 3,8 до 22,4 % (див. табл. 1). У мейоцитах, які мали уніваленти, в основному відбувалось випадкове розходження хромосом в анафазі I, що в подальшому могло призводити до утворення неповноцінних гамет.

На стадіях анафази 1 і 2 спостерігали за характером розходження хромосом до полюсів веретена поділу. Порушення мейозу на цих стадіях виявляються відставанням або викидом окремих хромосом (див. рисунок, б), утворенням мостів і фрагментів (табл. 2). Кількість клітин із порушеннями на цих стадіях коливалася в різних ліній від 4,8 до 18,7 %. Серед досліджених трансгенних ліній виявлено одну (Зимоярка 126р) зі значними системними порушеннями й найвищим рівнем аномалій мейозу — 18,7 %. Під час цитологічного дослідження в полі зору мікроскопа часто спостерігали відразу кілька клітин із порушеннями (див. рисунок, в).

Крім того, на стадії A2 були діади з асинхронним поділом, коли в одній клітині йшла стадія метафази, в другій — ранньої анафази/телофази (див. рисунок, г). Частота таких клітин змінювалась від 0,7 до 3,9 %.

ТАБЛИЦА 1. Асоціації хромосом різних зразків пшениці в метафазі I мейозу

Генотип	Досліджено рослин, шт.	Метафаза I				
		Досліджено метафаз, шт.		Тип кон'югації		
		клітин з бівалентами, шт.	клітин з унівалентами	клітин з бівалентами, шт.	клітин з унівалентами, шт.	
Контроль	4	59	21 ^u ₃ (56)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (2)	20 ^u ₃ + 2 ^u ₁ (1)	1,7
Зимоярка 32р	4	53	21 ^u ₃ (40)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (11)	20 ^u ₃ + 2 ^u ₁ (2)	3,8
Зимоярка 74р	3	42	21 ^u ₃ (30)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (5), 19 ^u ₃ + 2 ^u _в (3)	18 ₃ + 2 ^u _в + 2 ^u ₁ (4)	9,5
Зимоярка 86р	3	49	21 ^u ₃ (26)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (10), 19 ^u ₃ + 2 ^u _в (7)	19 ^u ₃ + 1 ^u _в + 2 ^u ₁ (6)	12,2
Зимоярка 93р	3	40	21 ^u ₃ (28)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (9)	20 ^u ₃ + 2 ^u ₁ (3)	7,5
Зимоярка 126р	4	49	21 ^u ₃ (27)	19 ^u ₃ + 2 ^u _в (7), 18 ^u ₃ + 3 ^u _в (4)	20 ^u ₃ + 2 ^u ₁ (8), 20 ^u ₃ + 3 ^u ₁ (3)	22,4
Зимоярка 134р	3	45	21 ^u ₃ (25)	20 ^u ₃ + 1 ^u _в (11), 19 ^u ₃ + 2 ^u _в (2)	19 ^u ₃ + 1 ^u _в + 2 ^u ₁ (7)	15,5

Примітка. В дужках зазначено кількість клітин, проаналізованих із даною асоціацією; індексами «з», «в», «п» позначено відповідно закриті й відкриті біваленти; 2^u — два уніваленти.

ТАБЛИЦА 2. Порухнення мейозу на стадіях А1 та А2

Генотип	Досліджено клітин, шт.	Всього порушень, %	Відстаючі хромосоми, %	Фрагменти, %	Мости, %	Викид хромосом, %	Асинхронний поділ, %
Контроль	350	1,7±0,7	—	1,7±0,7	—	—	—
Зимоярка 32р	260	4,8±1,3	Векторна конструкція рВі2Е 0,6±0,5	1,7±0,8	0,9±0,6	—	1,6±0,8
Зимоярка 74р	300	9,7±1,7	1,6±0,7	3,6±1,1	2,6±1,9	—	1,9±0,8
Зимоярка 86р	310	11,6±1,8	2,6±0,9	3,5±1,0	2,9±0,9	1,9±0,8	0,7±0,5
Зимоярка 93р	230	6,8±1,7	Векторна конструкція рВі-ОАТ —	2,9±1,1	1,4±0,8	2,5±1,0	—
Зимоярка 126р	290	18,7±2,3	6,1±1,4	2,6±0,9	2,3±0,9	3,8±1,1	3,9±1,1
Зимоярка 134р	280	13,2±2,0	2,8±0,5	4,3±1,2	3,7±1,1	2,4±0,9	—

На стадії Т1 формувались діади. Показано, що досі відсталі хромосоми й фрагменти, що залишалися в цитоплазмі і не відходили до полюсів, можуть елімінуватися, включатися в одне з телофазних ядер або ж утворювати мікроядра [1]. Одним із характерних порушень на цій стадії у трансгенних рослин були асиметричні поділи, внаслідок яких до полюсів відходили різні кількості хромосом (див. рисунок, д).

На останній стадії мейозу аналізували утворені тетради й визначали мейотичний індекс, що є показником нормального перебігу мейозу [8]. На стадії Т2 в кожному мікроспороциті зазвичай утворюються 4 ядра, після чого відбувається цитокінез, у результаті якого з'являються тетради, що з часом розпадаються на окремі одноядерні мікроспори, в яких у подальшому проходить гаметогенез і формується пилок. Порушення, що сталися на попередніх стадіях мейозу, виявляються в тетрадах у вигляді мікроядер, відсутності 1—2 мікроспор, появи триад або пентад, рідше — поліад.

Тетради з мікроядрами виявлено в усіх досліджених генотипів (табл. 3). Найбільшу кількість клітин із мікроядрами зафіксовано у лінії Зимоярка 126р (25,5 %), найменшу (5,8 %) — у лінії Зимоярка 32р. У ліній Зимоярка 86р та 126р спостерігали тетради з однією або двома відсутніми мікроспорами (див. рисунок, е), у лінії Зимоярка 74р — поодинокі клітини з тріадами (див. рисунок, е) і пентадами (див. рисунок, ж). Пентади склалися із п'яти дочірніх клітин — анеуплоїдних мікроспор. Головною причиною появи поліад, у тому числі й пентад, вважають порушення сегрегації хромосом, у результаті чого утворюється кілька дочірніх ядер замість двох. Крім того, до виникнення пентад може призводити формування триполюсних веретен у другому мейотичному поділі [16]. Поліади також можуть з'являтися в результаті порушення веретена поділу або через фрагментацію молодих ядер у Т2, що зумовлено порушеннями утворення фрагмопласта і клітинних стінок у тетрадах [15]. Появу в тетрадах без'ядерних мікроспор пояснюють наявністю автономного веретена на стадіях метафази 1 або 2, відсутністю кінетохорних фібрил, аномальним передчасним цитокінезом у профазі 2 [16].

Серед проаналізованих зразків виявлено дві лінії — Зимоярка 32р та 93р — з високим мейотичним індексом (відповідно 94,2 і 91,4 %); одна (Зимоярка 86р) — зі зниженим (81,6 %) та три (Зимоярка 126р, 134р, 74р) — з низьким (відповідно 59,3; 71,2; 74,4 %) (див. табл. 3). Високий мейотичний індекс (>85 %) мають цитологічно стабільні форми з нормальним перебігом мейозу, що зумовлює утворення життєздатного пилку, знижений — стабільні форми з певною кількістю порушень на стадіях М1—А2, що може призводити до зниження фертильності пилку, низький мейотичний індекс (<80 %) вказує на підвищений рівень порушень на цих стадіях і є показником нестабільності об'єктів, оскільки в них ще відбувається формоутворювальний процес [5].

Крім описаних порушень у лініях Зимоярка 86р і 126р спостерігали окремі пиляки, в клітинах яких відбувався клампінг (злипання) хромосом. У першій метафазі мейозу суперконденсовані хромосоми були тісно зближені й утворювали «грудки», в яких практично неможливо розрізнити окремі хромосоми (див. рисунок, з). В анафазах хромосоми «розтягувалися», до полюсів відходили різні кількості хроматину. Цитологічний прояв цієї мутації практично не відрізнявся від описаного в праці [13] для жита. Мікроспори, що утворювались наприкінці мейозу, мали різну кількість хроматину, відрізнялись за розміром ядер і могли бути стерильними. Частота таких клітин становила 2 %.

ТАБЛИЦЯ 3. Аналіз стадії тетрад і визначення мейотичного індексу

Генотип	Досліджено клітин, шт.	Стадія тетрад із них			Мейотичний індекс, %
		нормальні, шт.	з мікродрамами, %	з іншими порушеннями*, %	
Контроль	500	493	1,4±0,5	—	98,6±0,4
Зимоярка 32р	500	471	Векторна конструкція рВі2Е		94,2±1,0
Зимоярка 74р	550	409	17,2±1,6	8,4±1,2	74,4±1,9
Зимоярка 86р	610	498	14,1±1,4	4,3±0,8	81,6±1,6
Зимоярка 93р	550	503	Векторна конетрукція рВі-ОАТ		91,4±1,2
Зимоярка 126р	560	332	25,5±2,1	15,2±1,5	59,3±2,1
Зимоярка 134р	560	399	24,8±1,8	3,9±0,8	71,2±1,9

* До інших порушень належать тетради без 1—2 мікроспор, тріади, пентади.

ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

ТАБЛИЦА 4. Фертильность пылку досліджених форм

Генотип	Число пылковых зерен		Фертильность пылку, %
	фертильных	стерильных	
Контроль	1980	70	96,6±0,4
	Векторна конструкція pVi2E		
Зимоярка 32р	2040	210	90,7±0,6
Зимоярка 74р	1730	810	68,1±0,9
Зимоярка 86р	2100	780	72,9±0,8
	Векторна конструкція pVi-OAT		
Зимоярка 93р	2170	290	88,2±0,7
Зимоярка 126р	1180	1650	41,7±0,9
Зимоярка 134р	2030	960	67,9±0,8

Ми також визначали фертильність пылку досліджуваних ліній пшениці. На цитологічних препаратах фертильний пылок набував яскравого карміново-червоного кольору, мав зернисту цитоплазму, чітко сформовані два спермії та вегетативне ядро. Стерильні пылкові зерна майже не забарвлювалися карміном (табл. 4). Найнижчу фертильність пылку (41,7 %) мала лінія Зимоярка 126р.

Досліджувані лінії пшениці було розділено на дві групи: до першої увійшли трансгенні форми, які протягом трьох насінневих поколінь зав'язували від 20 до 40 насінин на рослину (Зимоярка 74р, 86р, 126р, 134р); другу сформували генотипи, кількість насіння в яких перевищувала 60 на рослину (Зимоярка 32р, 93р). Порівняно з контролем (рослини сорту Зимоярка, зав'язуваність насіння яких брали за 100 %) у ліній Зимоярка 74р, 86р, 126р, 134р вона становила 30–40 %, у ліній Зимоярка 32р, 93р — 90 %. Отже, середня зав'язуваність насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації у ліній Зимоярка 74р, 86р, 126р, 134р була значно нижчою порівняно з контролем, що свідчить про негативний вплив агробактерій на запилення (запліднення) пшениці. Це може бути пов'язано з прямою дією агробактерій на рослинні клітини або з опосередкованим впливом, оскільки інокуляційне середовище багате на вуглеводи й біологічно активні сполуки, що може стимулювати ріст сапрофітної мікрофлори, яка негативно позначається на процесах запилення та розвитку зав'язі.

Отже, у результаті дослідження перебігу мейозу в генетично модифікованих рослин пшениці встановлено, що отримані лінії різняться за рівнем цитологічної стабільності: 33,3 % (2 лінії) стабільні, з нормальним перебігом мейозу; 16,7 % (1 лінія) також стабільна, але з незначними порушеннями мейозу; 50 % (3 лінії) — генетично нестабільні, зі значними порушеннями мейозу. Ці лінії мали також низьку насінневу продуктивність.

Порівняльний аналіз перебігу мейозу виявив, що в трансгенних ліній, отриманих за використання штаму AGLO і векторної конструкції pVi2E, відсоток клітин із порушеннями на стадії метафази 1 значно нижчий, а мейотичний індекс відповідно вищий, ніж у ліній, отриманих за використання штаму AGLO і векторної конструкції pVi-OAT. Можливо, це є показником вищої стабільності геномів рослин-трансформантів із

конструкцією рВі2Е або ці конструкції вбудовуються в різні ділянки геному, що призводить до різних порушень у геномах рослин.

1. Белько Н.Б., Гордей И.А., Щетько И.С., Гордей И.М. Создание тетраплоидных форм озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием закиси азота и генетические эффекты дупликации генома // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць. — К.: Логос, 2011. — Т 10. — С. 15—20.
2. Воронова С.С., Бавол А.В., Дубровная О.В. Генетична трансформація in planta м'якої пшениці з використанням штаму АGLO, який містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази // Там само. — 2015. — Т. 17. — С. 126—130.
3. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровная О.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація in planta м'якої пшениці з використанням гена орнітинамінотрансферази // Там само. — С. 131—135.
4. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений // Генетика. — 2007. — **43**, № 1. — С. 5—17.
5. Лапочкина И.Ф., Иорданская И.В., Ячевская Г.Л. и др. Цитологическое изучение коллекции синтетической пшеницы из национальной коллекции злаков США (National Small Grain Collection of USDA-AKS) в условиях нечерноземной зоны России // С.-х. биология. — 2014. — № 3. — С. 77—82.
6. Лемеш В.А., Саматадзе Т.Е., Гузенко Е.В. и др. Особенности развития и репродукции трансгенных растений льна-долгунца // Онтогенез. — 2014. — **45**, № 6. — С. 406—411.
7. Лісовська Т.П., Кузьмішина І.І., Коцун Л.О. та ін. Мейотична мутація томату, що порушує конденсацію хроматину // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць. — К.: Логос. — 2014. — Т. 14. — С. 125—129.
8. Орловская О.А., Леонова И.Н., Салина Е.А., Хотылева Л.В. Особенности поведения хромосом в мейозе у линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала тетраплоидных видов рода *Triticum* // Экологическая генетика. — 2015. — **13**, № 1. — С. 16—22.
9. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1988. — 280 с.
10. Сечняк А.Л., Голуб Ю.В. Регулярность мейоза у гибридов аллоплазматических пшениц с пшенично-чужеродным амфилоидом // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. праць. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 157—161.
11. Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Преждевременный цитокinesis в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // Цитология. — 2008. — **50**, № 5. — С. 447—451.
12. Сидорчук Ю.В., Загорская А.А., Дейнеко Е.В. и др. Т-ДНК-индуцированные аномалии цветков и мужская стерильность у трансгенных растений табака: морфологический и цитологический анализ // Цитология и генетика. — 2000. — **34**, № 6. — С. 3—8.
13. Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А. и др. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапсиса // Генетика. — 2007. — **43**, № 10. — С. 1424—1433.
14. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений in planta // Биотехнология. — 2012. — № 1. — С. 8—20.
15. Шамина И.В., Дорогова Н.В., Загорская А.А. и др. Аномалии мужского мейоза в стерильной трансгенной линии табака RES91 // Цитология. — 2000. — **42**, № 12. — С. 1159—1164.
16. Шамина Н.В. Диагностикум аномалий растительного мейоза по его продуктам // Цитология. — 2006. — **48**, № 6. — С. 486—494.
17. Шкутина Ф.М., Козловская В.Ф. Цитомиксис в мейозе у некоторых гибридных форм злаков подтрибы *Triticinae* // Генетика. — 1974. — **10**, № 5. — С. 3—12.
18. Bardini M., Labra M., Winnfield M., Sala F. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. — 2003. — **72**, N 2. — P. 157—162.
19. Bhalla L., Ottenhof H.H., Singh M.B. Wheat transformation — an update of recent progress // Euphytica. — 2006. — **149**, N 3. — P. 353—366.
20. Castile L.A., Errampalli D., Atherton T.L. et al. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis* // Mol. Gen. Genet. — 1993. — **241**, N 5/6. — P. 504—514.
21. Errampalli D., Patton D., Castile L. et al. Embryonic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 1991. — **3**, N 2. — P. 149—157.
22. 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 Rep. — 2001. — **20**, N 4. — P. 325—330.

23. Laufs P., Aufran D., Traas J. A chromosomal paracentric inversions associated with T-DNA integration in *Arabidopsis* // Plant J. — 1999. — **18**, N 2. — P. 131–139.
24. Negruk V., Eisner G., Lemieux B. Addition-deletion mutations in transgenic *Arabidopsis thaliana* generated by the seed co-cultivation method // Genome. — 1996. — **39**, N 6. — P. 1117–1122.
25. Peirson B.N., Bowling S.E., Makaroff Ch. A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana* mutant // Plant J. — 1997. — **11**, N 4. — P. 659–669.
26. Sala F., Arencibia A., Castiglione S. et al. Somaclonal variation in transgenic plants // Acta Hort. — 2000. — **530**, N 48. — P. 411–419.
27. Shamina N.V., Dorogova N.V., Sidorchuk I.V. et al. Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA-tagged mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // Cell Biol. Int. — 2001. — **25**, N 4. — P. 367–369.
28. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M. et al. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // J. Biosci. Bioeng. — 2006. — **102**, N 3. — P. 162–170.
29. Tax F.E., Vernon D.M. T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics // Plant Physiol. — 2001. — **126**, N 4. — P. 1527–1538.
30. Xia G., Li Z., He C. et al. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Phytophysiol. Sini. — 1999. — **25**, N 1. — P. 22–28.
31. Zhao T., Zhao S., Chen H. et al. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Rep. — 2006. — N 11. — P. 1199–1204.

Отримано 27.11.2015

ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ,
ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ IN PLANTA

A.H. Гончарук, O.B. Дубровная, A.B. Бавол, C.C. Воронова, И.И. Лялько

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовано прохождение мейоза у генетически модифицированных растений пшеницы, полученных при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сорта Зимоярка методом in planta. Выявлено, что трансгенные формы характеризуются большей частотой нарушений мейоза по сравнению с нетрансгенными растениями. В результате сравнительного анализа течения мейоза установлено, что у трансгенных линий, полученных при использовании штамма AGLO и векторной конструкции pBi2E, процент клеток с нарушениями на стадии метафазы I был значительно ниже, а мейотический индекс соответственно выше, чем у линий, полученных при использовании штамма AGLO и векторной конструкции pBi-OAT. Определено, что количество клеток с нарушениями мейоза наибольшее у трансгенных растений линий с пониженной фертильностью пыльцы и низкой семенной продуктивностью.

PECULIARITIES OF MEIOSIS IN TRANSGENIC WHEAT PLANTS OBTAINED BY
AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION IN PLANTA

A.N. Goncharuk, O.V. Dubrovna, A.V. Baval, S.S. Voronova, I.I. Lyalko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The passing of meiosis in genetically modified wheat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation in planta variety Zimoyarka has been investigated. It is found that transgenic forms are characterized by a higher frequency of meiotic disorders compared to non-transgenic plants. Comparative analysis of the passing of meiosis showed that in transgenic lines obtained by using strain AGLO and vector construct pBi2E the percentage of cells with disorders at the stage metaphase I was much lower, and meiotic index respectively higher than in the lines obtained by using strain AGLO and vector construct pBi-OAT. It is shown that the percentage of cells with impaired meiosis was the largest in transgenic plants from lines that are characterized by reduced pollen fertility and low seed productivity.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation in planta, meiosis.