

УДК 581.143.6:58.085

ОДЕРЖАННЯ ТА АНАЛІЗ МЕТОДОМ IRAP-PCR ТРАНСГЕННИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

А. В. Бавол¹
О. В. Дубровна¹
Б. В. Моргун²

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ
²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

E-mail: bavo11@rambler.ru

Отримано 11.04.2013

Методом біолістичної трансформації з використанням калюсних культур, отриманих із верхівки пагона 3-добових стерильних проростків, та векторної конструкції рАНС25, яка містить селективний ген фосфіотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) і репортерний ген β-глюкуронідази, одержано трансгенні клітинні лінії м'якої пшениці. У дослідженні було використано калюси 14- та 28-добового віку. Добір стійких клітинних ліній здійснювали на середовищі з фосфіотрицином методами прямої та ступінчастої клітинної селекції. Трансгенний статус отриманих форм підтверджено ПЛР-аналізом. Із застосуванням IRAP ПЛР з праймером до довгих кінцевих повторів ретротранспозона SIRE 1 у трьох трансформованих ліній встановлено появу нових, відносно високомолекулярних (завдовжки понад 1 000 п. н.) ампліконів, що свідчить про транспозицію цього мобільного генетичного елемента. Оскільки нові фрагменти ДНК виявлено у трьох із семи досліджуваних ліній за відсутності їх у контрольному калюсі, це може вказувати, що індукція транспозиції SIRE 1, можливо, зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК або безпосередньо пов'язаним із процесом трансформації (мікропоранення, культивування на селективних середовищах).

Ключові слова: м'яка пшениця, біолістична трансформація, калюсні лінії, ретротранспозон SIRE 1, IRAP ПЛР.

Технологія генетичної трансформації має великі перспективи в селекції рослин для поліпшення господарсько-корисних ознак, зокрема урожайності, підвищення якості, стійкості до патогенів і шкідників [1, 2]. Для пшениці найперспективнішим методом генетичної інженерії вважають біолістичну трансформацію, оскільки тканини цієї культури мають низьку чутливість до агробактеріальної інфекції [3]. На сьогодні більшість протоколів одержання генетично модифікованих організмів передбачає використання культури *in vitro*, зокрема етапи калюсоутворення та регенерації рослин. Слід враховувати, що за таких умов може виникати значна кількість мутацій, відомих під загальною назвою соматональної мінливості [4, 5]. Однак, окрім мутагенного ефекту культури тканин процес трансформації супроводжується додатковим стресом, пов'язаним із механічними пораненнями та культивуванням на селективних середовищах (у разі використання бомбардування мікрочастинками), а також зі вбудовуванням використаної генетичної конструкції в геном реципієнта [6].

Попри те, що темпи одержання і вирощування генетично модифікованих культур постійно зростають, залишається питання, наскільки точно сучасні методи генетичної інженерії можуть забезпечити перенесення в геном чужорідних генів та скільки передбачуваних генетичних і епігенетичних наслідків при цьому може виникати [7]. Наслідком перенесення чужорідної ДНК може бути порушення стабільності геному трансформованої рослини, проте цій проблемі приділяють мало уваги, хоча такі дослідження пов'язані не лише з фундаментальними питаннями організації та функціонування геному загалом, але й і з проблемою безпеки споживання трансгенних рослин.

Встановлено, що інтеграція чужорідної ДНК в ядерний геном може призвести як до епігенетичних змін, зокрема зміни рівня метилування ДНК, так і до активації транскрипції мобільних генетичних елементів (МГЕ) [8]. Наприклад, інтрогресія чужорідного хроматину шляхом статевіої гібридизації рису виявила одночасну активацію декількох МГЕ, яка супроводжувалася змінами рівня їх метилування [9]. Matzke та ін.

[10, 11] отримали дані, які переконливо свідчать про те, що за присутності трансгенів у геномі реципієнта спостерігається підвищення частоти генетичних перебудов та активація МГЕ. Явище транспозиції становить значний інтерес, оскільки відіграє істотну роль як у зміні експресії структурних генів, так і в індукції хромосомних аберацій [12–15].

На сьогодні одним із перспективних методів дослідження мінливості геному є виявлення поліморфізму ампліфікованих міжретротранспозонних послідовностей — irap (inter retrotransposone amplified polymorphism — метод ампліфікації геномної ДНК між близько розташованими послідовностями ретротранспозонів). Присутність у геномі рослин значної кількості мобільних генетичних елементів та їхня здатність до самостійного копіювання дає змогу методом IRAP-аналізу ідентифікувати відносно недавні зміни геному, зокрема спричинені дією стресових чинників. Одним із ретротранспозонів, застосовуваних для аналізу геномних перебудов у рослин, є SIRE 1, який належить до родини *Ty1*-сорія-подібних ретроелементів, має довжину близько 12 т. п. н. і присутній у геномі багатьох видів рослин, у тому числі пшениці. У цій роботі було використано праймер, споріднений до довгих кінцевих повторів (LTR-послідовностей) SIRE-1. Ця ділянка містить малоповторювані послідовності нуклеотидів і є однією з найконсервативніших. Саме тому зміни в довжині міжретротранспозонових послідовностей, що можна зафіксувати як появу чи зникнення або зміну розміру IRAP-ампліконів, можуть слугувати об'єктивним критерієм мінливості геному.

Метою роботи було одержання трансформованих клітинних ліній м'якої пшениці методом біолістичної трансформації та аналіз отриманих форм з використанням методу IRAP ПЛР з праймером до LTR-послідовностей SIRE 1.

Матеріали і методи

Культивування калюсів. Матеріалом досліджень був сорт-дворучка Зимоярка, створений в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили за розробленою нами методикою [16]. Для одержання калюсних культур як експланти використовували верхівку пагона 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених в умовах *in vitro*. Вихідний калюс розді-

ляли на 2 частини. Одну частину було використано для проведення генетичної трансформації, іншу — паралельно пасажували на живильному середовищі МС [17].

Генетичну трансформацію здійснювали біолістичним методом, застосовуючи саморобну гармату типу particle inflow gun (PIG). У дослідженнях було використано векторну конструкцію рАНС25 [18], яка містить селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що забезпечує стійкість трансформованих клітинних ліній до фосфінотрицину, та репортерний ген β -глюкуронідази (GUS). Для приготування золотих частинок із нанесеною плазмідною ДНК до 50 мкл суспензії частинок золота (30 мг/мл у 50% -му гліцеролі) діаметром 0,6 мкм (Bio-Rad) додавали 10 мкл плазмідної ДНК (1 мкг/1 мкл) та 20 мкл розчину ПЕГ/MgCl₂ (50% ПЕГ 2000, 5М MgCl₂) у співвідношенні 4:1. Після інкубації протягом щонайменше 30 хв за кімнатної температури частинки центрифугували 1 хв при 2 000 об/хв, відбирали надосадову рідину й ресуспендували в 60 мкл абсолютного етилового спирту. Калюси за 4 год до обстрілу викладали на середовище N6 [19] з 0,3 М манітолом до центру в коло діаметром 3 см. Чашки з калюсами встановлювали на відстані 14 см від решітки, на яку наносили частинки з ДНК (6 мкл). Перед обстрілом тиск у камері зменшували до 0,07 атмосфер.

Після інкубування в темряві за температури 27 °С упродовж ночі калюси перенесли на середовище N6, через 3 доби — на селективне середовище. Експресію GUS виявляли за допомогою гістохімічного фарбування тканин *in situ* [20].

Виділення ДНК. ДНК калюсних культур виділяли згідно з методикою Деллапорта [21] з певними модифікаціями. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично.

Ампліфікацію ДНК проводили на приладі «Терцик» (ДНК-технологія). Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 25 мкл: 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 150 мМ MgCl₂, 200 мкМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), 0,4 мкМ праймера, 1 од. акт. Таq ДНК-полімерази (Thermo Scientific) та 100–120 нг загальної ДНК. Ампліфікацію здійснювали за такою програмою: початкова денатурація при 94 °С 5 хв; 37 циклів (денатурація 94 °С — 30 с, відпал 58 °С — 90 с, елонгація 72 °С — 2 хв), фінальна елонгація — 72 °С 10 хв. Для проведення ПЛР використовували одиничний праймер до LTR соєвого ретротранспозона SIRE 1, що має нуклео-

тидну послідовність 5'-GCACT TATGC AAGTG GGATC AGC-3' [22]. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,6%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводили за напруги 2 в/см у трис-ацетатному буфері. Спектри продуктів ПЛР візуалізували під УФ-променями. Для оцінювання розмірів ампліконів застосовували маркер 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Кількісна та якісна оцінка результатів ПЛР. Розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакета прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics) [23]. Для кількісної оцінки отриманих результатів дані було подано у вигляді бінарних матриць, у яких наявність/відсутність однакових за розміром ампліконів відповідала значенням 1 або 0. Генетичні відстані вираховували, користуючись мірою подібності згідно з Nei та Li [23]. Перевірку стабільності ПЛР-реакції здійснювали шляхом трикратного повторення ампліфікації з одним і тим самим праймером на тому самому рослинному матеріалі.

Результати та обговорення

У наших дослідженнях для біолістичної трансформації було використано калюси, індуковані з верхівки пагона 3-добового проростка 14- та 28-добового віку, загалом — 1 600 калюсів у експериментальних варіантах та вдвічі менше — для контролю. Добір трансформованих клітинних ліній здійснювали на середовищі з фосфінотрицином. У роботі застосовували дві схеми селекції: пряму та ступінчасту. За прямої селекції *in vitro* калюси висаджували на середовище з 10 мг/л фосфінотрицину. Після трьох пасажів було отримано 4 стійкі клітинні лінії у варіанті з 14-добовими калюсами та 9 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калюсами. Також використовували ступінчасту клітинну селекцію: після трансформації калюси висаджували на середовище з 2 мг/л фосфінотрицину, а в наступних двох пасажах концентрацію селективного агента збільшували відповідно до 5 та 10 мг/л. Завдяки такому підходу вдалося отримати 7 клітинних ліній у варіанті з 14-добовими калюсами та 11 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калюсами. Водночас у контрольному варіанті за прямого та ступінчастого добору стійких до фосфінотрицину клітинних ліній отримано не було.

Далі для виявлення стабільної експресії гена GUS проводили гістохімічне фарбуван-

ня тканин калюсу через 42 доби після трансформації (останній пасаж на селективному середовищі). Для цього відбирали невеликі шматочки з калюсів, які задовольняли таким критеріям: активно росли на селективному середовищі з фосфінотрицином і зберігали морфогенний потенціал. Загалом, із 31 отриманої клітинної лінії тільки 18 відповідали цим параметрам. Експресію гена GUS (за фенотиповим проявом) підтверджено у 10 клітинних ліній (рис. 1). Однак за подальшого культивування три лінії було відбраковано через низьку динаміку росту на селективному середовищі.

Таким чином, нами було відібрано 7 клітинних ліній у яких відзначено експресію генів *bar* (фенотипова ознака — активний ріст на середовищі із селективним агентом — фосфінотрицином) та GUS (фенотипова ознака — наявність стабільного забарвлення калюсів).

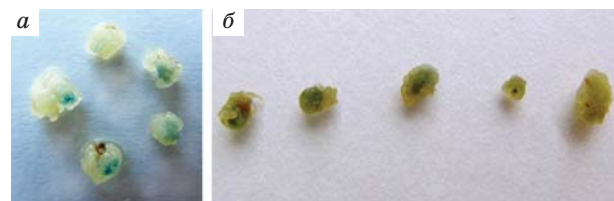


Рис. 1. Експресія маркерного гена GUS (за фенотипом):

a — транзйентна експресія (24 год після біолістичної трансформації, випадково вибрані зразки);

б — стабільна експресія (42-га доба після біолістичної трансформації)

Щоб підтвердити трансгенний статус отриманих клітинних ліній, проводили ПЛР-аналіз (рис. 2), що показав наявність гена *bar* у ДНК досліджуваних об'єктів.

Паралельно з добором на селективних середовищах здійснювали IRAP-аналіз матеріалу на стадії первинного калюсу, а також на 3- і 6-му пасажах. Дослідження проводили на семи клітинних лініях (LT1–LT7). Контролем слугували калюси (контрольні групи по 10 калюсів), які не піддавали трансформації, але культивували за таких самих умов та на тих самих середовищах. Схему експерименту наведено на рис. 3.

Відомо, що в процесі сумісної еволюції сформувались механізми, що захищають геном хазяїна від чужорідної транспозиції, зокрема описано її пригнічення на транскрипційному (сайленсинг шляхом метилування ДНК) та посттранскрипційному (сайленсинг за рахунок РНК-інтерференції) рівнях [24, 25]. Тому за звичайних умов

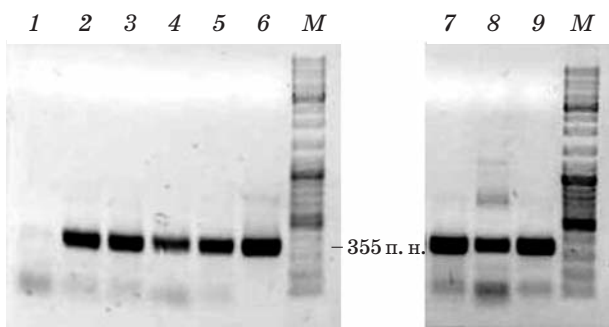


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків із використанням праймерів до гена *bar* (очікуваний розмір фрагмента 355 п. н.):

- 1 — негативний контроль (ДНК нетрансформованого калюсу);
- 2 — клітинна лінія LT1;
- 3 — клітинна лінія LT2;
- 4 — клітинна лінія LT3;
- 5 — клітинна лінія LT4;
- 6 — позитивний контроль (pАНС25);
- 7 — клітинна лінія LT5;
- 8 — клітинна лінія LT6;
- 9 — клітинна лінія LT7;
- M — маркер молекулярної маси (100 bp DNA Ladder)

активність ретротранспозонів відсутня або спостерігається на незначному рівні [26, 27]. В умовах експерименту нам не вдалося зафіксувати транспозицію у вихідних та контрольних форм. Загалом, у нетрансформованих первинних калюсах, а також калюсах 3-го та 6-го пасажів виявлено 10 чітких ампліконів розміром від 407 до 1 360 п. н. У всіх досліджуваних об'єктів показано ідентичний спектр продуктів ПЛР. На рис. 4 подано по одному зразку із кожної досліджуваної вибірки.

Наступним етапом досліджень було виявлення поліморфізму ДНК у трансформованих форм. Для цього відбирали зразки калюсних ліній LT1–LT7. Отримані результати наведено на рис. 5.

На отриманих електрофореграмах продуктів ПЛР кожен амплікон відповідає анонімному локусу між двома близько розташованими копіями SIRE-1, оскільки застосований праймер споріднений до LTR-послідовностей, а загальна довжина цього ретротраспозона становить близько 12 тис. п. н., що унеможливує синтез фрагментів у межах однієї копії. Таким чином, кожен новий виявлений амплікон фіксує виникнення нового міжретранспозонного локусу, тобто свідчить про подію транспозиції.

Нами відзначено появу нових, відносно високомолекулярних (завдовжки більше 1 000 п. н.) ампліконів у трьох трансформованих ліній — LT2, LT6 та LT7 (таблиця). Зокрема у двох останніх виявлено по два амплікони.

Поява кількох нових ампліконів, а також те, що їх було виявлено у трьох із семи досліджуваних клітинних ліній може вказувати на відносно високу частоту подій транспозиції у ДНК трансформованих клітинних ліній. За умов проведеного експерименту нами не зареєстровано зникнення ампліконів у ДНК-профілях ПЛР, що підтверджує відсутність відомих перебудов у сайтах зв'язування з праймером та в досліджуваних локусах, фланкованих LTR ретротранспозона SIRE-1.



Рис. 3. Схема експерименту

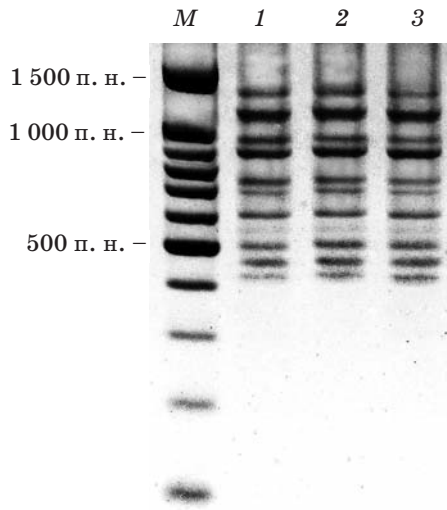


Рис. 4. Спектр продуктів ампліфікації ДНК:
 M — маркер молекулярних мас (100 bp DNA Ladder);

1 — первинний нетрансформований калюс;
 2 — нетрансформований калюс 3-го пасажу;
 3 — нетрансформований калюс 6-го пасажу

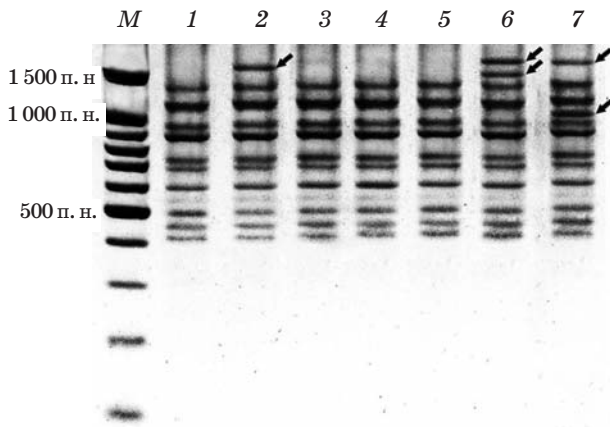


Рис. 5. Спектр продуктів ампліфікації ДНК:
 M — маркер молекулярної маси (100 bp DNA Ladder);

1 — клітинна лінія LT1;
 2 — клітинна лінія LT2;
 3 — клітинна лінія LT3;
 4 — клітинна лінія LT4,
 5 — клітинна лінія LT5;
 6 — клітинна лінія LT6;
 7 — клітинна лінія LT7.
 Стрілками показано нові амплікони

Приблизна довжина нових виявлених ампліконів у трансформованих лініях

Зразок	Кількість нових ампліконів	Приблизна довжина ампліконів, п. н.
LT2	1	1 567
LT6	2	1 491, 1 660+*
LT7	2	1 075, 1 660+*

Примітка: * — за підрахунку довжини ампліконів на пакеті прикладних програм TotalLab v.2.01 отримано значення 1 660 п. н. (лінія LT6) та 1 651 п. н. (лінія LT7), однак оскільки різниця між цими значеннями менша інструментальної похибки методу (що включає роздільну здатність електрофоретичного методу та похибку обчислення), фрагменти умовно позначено як 1 660+, що може свідчити як про ідентичність, так і абсолютну неподібність їх за нуклеотидним складом (локусом транспозиції).

Слід зазначити, що в літературі було описано транспозиційну активність ретротранспозонів *Tos17* у трансформованих рослин рису [6] і *Tag1* в арабідопсису [28]. Автори також відзначають відсутність такої активності у контрольних рослин. Хоча використаний нами метод не дає змоги безпосередньо виявити транскрипційну і транспозиційну активність ретротранспозонів, однак він може бути швидким та ефективним інструментом дослідження змін геному за генетичної трансформації та підтвердження транспозиції МГЕ.

Таким чином, методом біоістичної трансформації нами було отримано трансформовані клітинні лінії м'якої пшениці та підтверджено їхній трансгенний статус. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу з використанням IRAP ПЛР із праймером до LTR-последовностей ретротранспозона SIRE 1 у трьох трансформованих ліній — LT2, LT6 та LT7 зафіксовано появу нових, відносно високомолекулярних (завдовжки більше 1 000 п. н.) ампліконів, що свідчить про транспозицію даного МГЕ. Оскільки нові фрагменти ДНК виявлено у трьох із семи досліджуваних ліній за відсутності їх у контрольному калюсі, це може свідчити, що індукція транспозиції SIRE 1, імовірно, зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК або безпосередньо пов'язаним із процесом трансформації (мікропоранення, культивування на селективних середовищах).

ЛІТЕРАТУРА

1. *Clive J.* Global Status of Commercialized Biotech // GM Crops ISAAA Brief. — 2011. — V. 43. — P. 1–8.
2. *Abdul R., Ma Z., Wang H.* Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L): A Review // *Triticeae Genom. Genet.* — 2010. — V. 1, N. 2. — P. 1–7.
3. *Rakszegi M., Tamas S., Szucs P. et al.* Current status of wheat transformation // *J. Plant Biotechnol.* — 2001. — V. 3. — P. 67–81.
4. *Cassells A. C., Curry R. F.* Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 2001. — V. 64. — P. 145–157.
5. *Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al.* Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // *Plant Growth Regul.* — 2002. — V. 37. — P. 263–285.
6. *Wu R., Guo W. L., Wang X. R. et al.* Unintended consequence of plant transformation: biolistic transformation caused transpositional activation of an endogenous retrotransposon *Tos17* in rice ssp. japonica cv. Matsumae // *Plant Cell Rep.* — 2009. — V. 28, N 7. — P. 1043–1051.
7. *Lu B. R., Snow A. A.* Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences // *Bio. Sci.* — 2005. — V. 55. — P. 669–678.
8. *Muller K., Heller H., Doerfler W.* Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — P. 14271–14278.
9. *Shan X. H., Liu Z. L., Dong Z. Y., et al.* Mobilization of the active MITE transposons mPing and Pong in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.) // *Mol. Biol. Evol.* — 2005. — V. 22. — P. 976–990.
10. *Matzke A. J. M., Matzke M. A.* Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 1998. — V. 1. — P. 142–148.
11. *Matzke M. A., Mette M. F., Matzke A. J. M.* Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 43. — P. 401–415.
12. *Todorovska E.* Retrotransposons and their role in plant – genome evolution // *Biotechnol. Equip.* — 2007. — N. 21. — P. 294–305.
13. *Kidwell M. G., Lisch D. R.* Hybrid genetics. Transposons unbound // *Nature.* — 1998. — V. 393. — P. 22–23.
14. *Kidwell M. G., Lisch D. R.* Transposable elements and host genome evolution // *Trends Ecol. Evol.* — 2000. — V. 15. — P. 95–99.
15. *Kumar A., Bennetzen J. L.* Plant retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* — 1999. — V. 33. — P. 479–532.
16. *Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І.* Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // *Вісн. Укр. тов. генет. селекц.* — 2007. — Т. 5, № 1–2. — С. 3–10.
17. *Бавол А. В., Моргун Б. В., Нітовська І. О. та ін.* Генетична трансформація пшениці з використанням калюсних культур, отриманих з апікальної меристеми пагона // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. праць.* — 2012. — Т. 4. — С. 411–416.
18. *Christensen A. H., Quail P. H.* Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // *Transg. Res.* — 1996. — V. 5, N 3. — P. 213–218.
19. *Pescitelli S. M., Sukhapinda K.* Stable transformation via electroporation into maize Type II callus and regeneration of fertile transgenic plants // *Plant Cell Rep.* — 1995. — V. 14. — P. 712–716.
20. *Jefferson R. A.* Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 1987. — V. 5. — P. 387–405.
21. *Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J.* Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 2001. — V. 67, N 2. — P. 73–80.
22. *Календарь Р. В., Глазко В. И.* Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // *Физиол. биохим. культ. раст.* — 2002. — Т. 34, № 4. — С. 279–296.
23. *Nei M., Li W. H.* Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1979. — V. 76. — P. 5269–5273.
24. *Casacuberta J. M., Santiago N.* Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes // *Gene.* — 2003. — V. 311. — P. 1–11.
25. *Lister R., O'Malley R. C., Tonti-Filippini J. et al.* Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* // *Cell.* — 2008. — V. 133. — P. 523–536.
26. *Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. et al.* Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces // *Plant Cell.* — 2010. — V. 22, N 6. — P. 1686–1701.
27. *Vicient C. M.* Transcriptional activity of transposable elements in maize // *BMC Genomics.* — 2010. — V. 11, N 601. — P. 1–10.
28. *Bhatt A. M., Lister C., Crawford N., Dean C.* The transposition frequency of *Tag1* elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines // *Plant Cell.* — 1998. — V. 10. — P. 427–434.

**ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ
МЕТОДОМ IRAP-PCR
ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ**

*A. V. Bovol*¹
*O. V. Dubrovna*¹
*B. V. Morgun*²

¹Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины,
Киев

²Институт клеточной биологии и генетической
инженерии НАН Украины,
Киев

E-mail: bovol1@rambler.ru

**GENETIC TRANSFORMATION
AND ANALYSIS OF WHEAT
TRANSGENIC CELL LINES
BY IRAP-PCR**

*A. V. Bovol*¹
*O. V. Dubrovna*¹
*B. V. Morgun*²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: bovol1@rambler.ru

Методом биолиственной трансформации с использованием каллусных культур из верхушки побега 3-суточных стерильных проростков и векторной конструкции pAHC25, содержащей селективный ген фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы (*bar*) и репортерный ген β-глюкуронидазы, получены трансгенные клеточные линии мягкой пшеницы. В исследовании были использованы каллусы 14- и 28-суточного возраста. Отбор устойчивых клеточных линий проводили на среде с фосфинотрицином методами прямой и ступенчатой клеточной селекции. Трансгенный статус полученных форм подтвержден ПЦР-анализом. С применением IRAP ПЦР с праймером к длинным концевым повторам ретротранспозона SIRE 1 у трех трансформированных линий отмечено появление новых, относительно высокомолекулярных (длиной более 1 000 п. н.) ампликонов, что подтверждает транспозицию этого мобильного генетического элемента. Поскольку новые фрагменты ДНК обнаружены у трех из семи исследуемых линий и отсутствовали у контрольного каллуса, это может свидетельствовать, что индукция транспозиции SIRE 1, вероятно, обусловлена геномным стрессом, вызванным встраиванием чужеродной ДНК или непосредственно связанным с процессом трансформации (микроранение, культивирование на селективных средах).

Ключевые слова: мягкая пшеница, биолиственная трансформация, каллусные линии, ретротранспозон SIRE 1, IRAP ПЦР.

The transgenic wheat cell lines were obtained via biolistic transformation of the callus cultures initiated from the 3-day-old sterile seedling shoot apices. The pAHC25 vector construction used for 14- and 28-day-old callus cultures transformation carried the selective phosphinothricin-N-acetyltransferase (*bar*) gene and reporter β-glucuronidase gene. The cell line selection was carried out on the media with phosphinothricin by means of graduated cell selection. The transgenic status of the obtained forms was proved by PCR-analysis. The presence of new relatively high molecular (more than 1 000 bp) amplicons were found out for three transformed lines by means of IRAP PCR-analysis with the primers coding for long terminal repeats sequences of SIRE 1 retrotransposon. This fact may prove transposition of this mobile genetic element. The new DNA fragments were detected for three of the seven analyzed lines but for the control callus. It is possible to assume at induction of SIRE 1 transposition is probably caused by the genomic stress of foreign DNA inserting or associated with the transformation process (mechanical wounding, cultivation on selective media).

Key words: bread wheat, biolistic transformation, cell lines, the SIRE 1 retrotransposon, IRAP PCR.