

УДК 577.21:57.085.1:577.233.3:633

IRAP-АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ, ОТРИМАНИХ ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ IN VITRO

О.В. ДУБРОВНА, О.М. ГОНЧАРУК, Л.Г. ВЕЛИКОЖОН

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

Проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозонів, у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі in vitro, що містять ген орнітінамінотрансферази. Найбільш результативним було застосування праймера до ретротранспозону Sukkula, де в спектрі продуктів ампліфікації ДНК отримали чотири нові амплікони у дев'яти досліджених рослин. Ці дані підтвердили, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію ретротранспозонів Sukkula/Nikita та Wham/Sabrina, оскільки у контрольних рослин, отриманих у культурі in vitro, їх активність не встановлена.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, ретротранспозони, 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 [7, 14]. На сьогодні більшість протоколів отримання генетично модифікованих організмів передбачає використання культури in vitro, в тому числі етапи калусоутворення та регенерації рослин. Слід враховувати, що за таких умов може виникати багато мутацій, відомих під загальною назвою соматоклональна мінливість [12, 17]. Однак крім мутагенного ефекту культури тканин процес трансформації супроводжується додатковим стресом, пов'язаним із механічними пораненнями й культивуванням на селективних середовищах, а також із вбудовуванням використаної генетичної конструкції в геном реципієнта [34].

Хоча темпи отримання й вирощування генетично модифікованих культур постійно зростають, все ще не вирішені питання, наскільки точно сучасні методи генетичної інженерії можуть забезпечити перенесення в геном чужорідних генів і скільки непередбачуваних генетичних та епігенетичних наслідків при цьому може виникати [26]. Наслідком перенесення чужорідної ДНК може бути порушення стабільності геному трансформованої рослини. Цій проблемі приділяється недостатньо уваги, хоча такі дослідження пов'язані не лише з фундаментальними питаннями організації та функціонування геному в цілому, а й із проблемою безпеки споживання трансгенних рослин.

© О.В. ДУБРОВНА, О.М. ГОНЧАРУК, Л.Г. ВЕЛИКОЖОН, 2017

Встановлено, що інтеграція чужорідної ДНК в ядерний геном може призвести як до епігенетичних змін, зокрема зміни рівня метилування ДНК, так і активації транскрипції мобільних генетичних елементів (МГЕ) [29]. Мацке зі співавт. [27, 28] отримали дані, які переконують, що за наявності трансгенів у геномі реципієнта збільшується частота генетичних перебудов та активуються мобільні генетичні елементи. Явище транспозиції дуже цікаве, оскільки задіяне як у зміні експресії структурних генів, так і індукції хромосомних аберацій [21–23, 31].

За накопиченими на сьогодні даними щодо мобільних генетичних елементів розроблено способи оцінювання поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами, зокрема довгих термінальних ділянок (LTR) ретротранспозонів [19, 20].

У літературі описано можливість використання праймерів, специфічних до LTR послідовностей ретротранспозонів, для виявлення поліморфізму між досліджуваними формами за допомогою ПЛР-фінгерпринту на основі IRAP-аналізу (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) [5, 6, 19, 20]. Перевагою такого підходу є можливість одночасного аналізу багатьох анонімних локусів у різних ділянках геному. Численні літературні джерела свідчать про ефективність використання цього методу для дослідження генетичних зв'язків між популяціями і видами, генетичного картування та аналізу соматональних варіацій у злакових культур [8, 30].

Значна поширеність у геномі рослин мобільних генетичних елементів та їх здатність до самостійного копіювання дає змогу методом IRAP-аналізу ідентифікувати відносно недавні зміни геному, в тому числі зумовлені дією стресових чинників. Саме тому зміни довжини міжретротранспозонних послідовностей, що можна зафіксувати як появу чи зникнення або зміну розміру IRAP-ампліконів, слугують об'єктивним критерієм мінливості геному.

Ми методом IRAP-аналізу дослідили активність МГЕ в трансформованих векторною конструкцією рАНС25 калюсних ліній пшениці сорту Зимоярка [3]. Було використано праймер, споріднений до LTR-послідовностей ретротранспозону SIRE-1. У трьох трансформованих ліній виявлено появу нових, відносно високомолекулярних (завдовжки понад 1000 пн) ампліконів. Поява кількох нових ампліконів, а також те, що їх було виявлено у трьох із семи досліджених калюсних ліній може вказувати на відносно високу частоту подій транспозиції у ДНК трансформованих форм.

Слід зазначити, що мутаційний процес, індукований *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією, є побічним ефектом який супроводжує створення генетично модифікованих рослин. Дослідження цього процесу важливе, оскільки інсерція екзогенної ДНК може впливати не тільки на функціонування окремих генів, а й призводити до масштабних хромосомних перебудов і значною мірою змінювати фенотип рослин [15, 16, 18, 24].

У зв'язку з цим ми поставили за мету проаналізувати рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозонів у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*.

Методика

Матеріалом досліджень були генетично модифіковані рослини пшениці сорту Зимоярка, отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням штаму AGLO, що містив вектор pBi-OAT із цільовим геном орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula*, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli* (люб'язно наданий д-ром біол. наук А.В. Кочетовим). Умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації описані в праці [2]. Трансгенний статус рослин перевірено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

У цій роботі ми вивчали: 1) вихідний матеріал — рослини пшениці сорту Зимоярка (10 рослин); 2) генетично модифіковані рослини, які містили ген орнітинамінотрансферази (14 рослин); 3) контрольні рослини-регенеранти, отримані з калюсів, без проведення генетичної трансформації (10 рослин).

ДНК з листків екстрагували за допомогою комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Кінцевий об'єм реакційної суміші становив 20 мкл: 10 ммоль *tris*-HCl, 50 ммоль KCl, 2,0 ммоль MgCl₂, 2 ммоль кожного дезоксинуклеотидтрифосфату (dNTR), 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Таq ДНК полімерази та 100—130 нг досліджуваної ДНК.

Ампліфікацію проводили за такою програмою: початкова денатурація за 94 °C протягом 4 хв, 34 цикли (денатурація при 94 °C — 30 с, відпал при 55 °C — 1 хв, елонгація при 72 °C — 3 хв) та фінальна елонгація за 72 °C упродовж 5 хв. У дослідженнях використано IRAP-праймери до LTR ділянок різних ретротранспозонів (табл. 1), що виявились ефективними при аналізі злакових культур [9, 32].

До реакційної суміші праймери додавали окремо або в комбінації (два праймери одночасно). Продукти ампліфікації розділяли в 1,5 %-му агарозному гелі, фарбували розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі й фотографували. Розміри продуктів ампліфікації оцінювали за допомогою маркера GeneRuler DNA Ladder Mix

ТАБЛИЦЯ 1. IRAP-праймери, використані в дослідженні

Праймер	Ретротранспозон	Нуклеотидна послідовність
Wis	Wis2	5'-TAATTTCTGCAACGTTCCCAACA-3'
Wi1	Wilma	5'-AGCATGATGCAAAATGGACGTATCA-3'
Wi2	Wilma	5'-AGAGCCTTCTGCTCCTCGTTGGGT-3'
Da	Daniela	5'-TACCCCTACTTTAGTACACCGACA-3'
Wh	Wham	5'-GGAAAAGTAGATACGACGGAGACGT-3'
Ni	Nikita	5'-CGCTCCAGCGGTAAGTCC-3'
Sa	Sabrina	5'-GCAAGCTTCCGTTTCCGC-3'
Su	Sukkula	5'-GATAGGGTTCGCATCTTGGGCGGTGAC-3'
St	Stowaway	5'-CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT-3'

(Thermo Scientific). Розмір продуктів ПЛР визначали із використанням пакета прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). Стабільність синтезу ампліконів перевіряли триразовим повторенням ампліфікації на тому ж рослинному матеріалі.

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження важливо було переконатися в ефективності досліджуваних праймерів та можливості їх застосування для аналізу геному пшениці. Для цього згідно з описаними методиками проводили ПЛР із кожним індивідуальним праймером на зразках 10 довільних рослин вихідного сорту. За характером отриманих спектрів продуктів ампліфікації ДНК було виділено три групи праймерів: 1) високоефективні (Su, Sa, Wh, Ni, Wi1) — праймери, за використання яких у спектрах продуктів ПЛР можна чітко ідентифікувати певну кількість ампліконів; 2) неефективні (Wis) — праймери, за використання яких формувалася суцільний шлейф із продуктів ПЛР, що унеможливило розрізнення окремих ампліконів; 3) неробочі (Da, St, Wi2) — праймери, за використання яких ПЛР не відбувалася.

У ході роботи ми визначали генетичну гомогенність контрольних рослин за досліджуваними локусами. Всі високоефективні праймери (Su, Sa, Wh, Ni, Wi1) продемонстрували ідентичні спектри продуктів ампліфікації у різних зразків (рис. 1).

Отримані дані підтвердили, що у вихідному матеріалі (рослинах) за досліджуваними локусами відсутній природний та (або) спонтанний поліморфізм. В умовах експерименту нам не вдалося зафіксувати транспозицію у вихідних і контрольних форм. Загалом у вихідних рослин

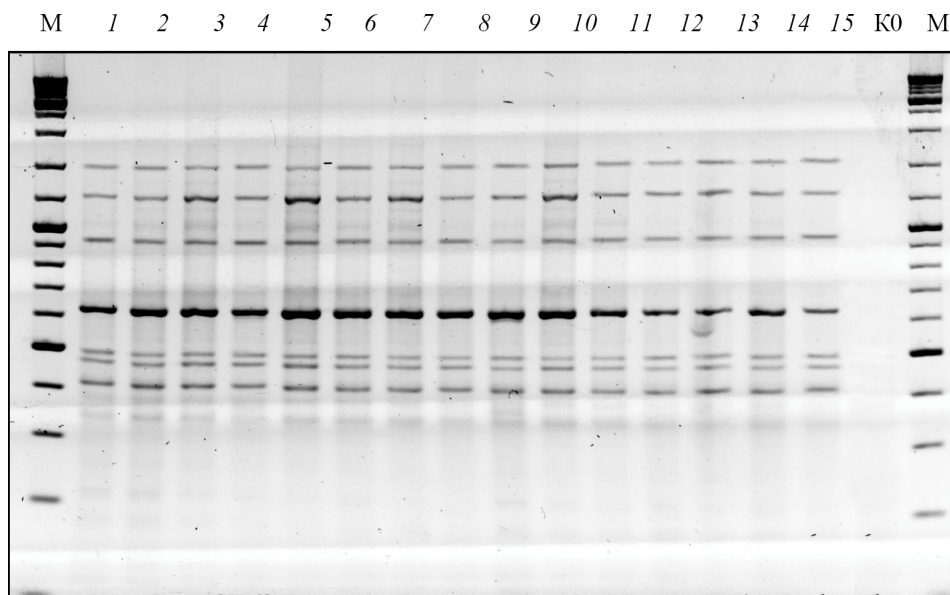


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймера Sa:

M — маркер молекулярних мас (GeneRuler DNA Ladder Mix); 1—7 — рослини вихідного сорту Зимоярка; 8—15 — контрольні рослини-регенеранти; K0 — негативний контроль (TE-буфер)

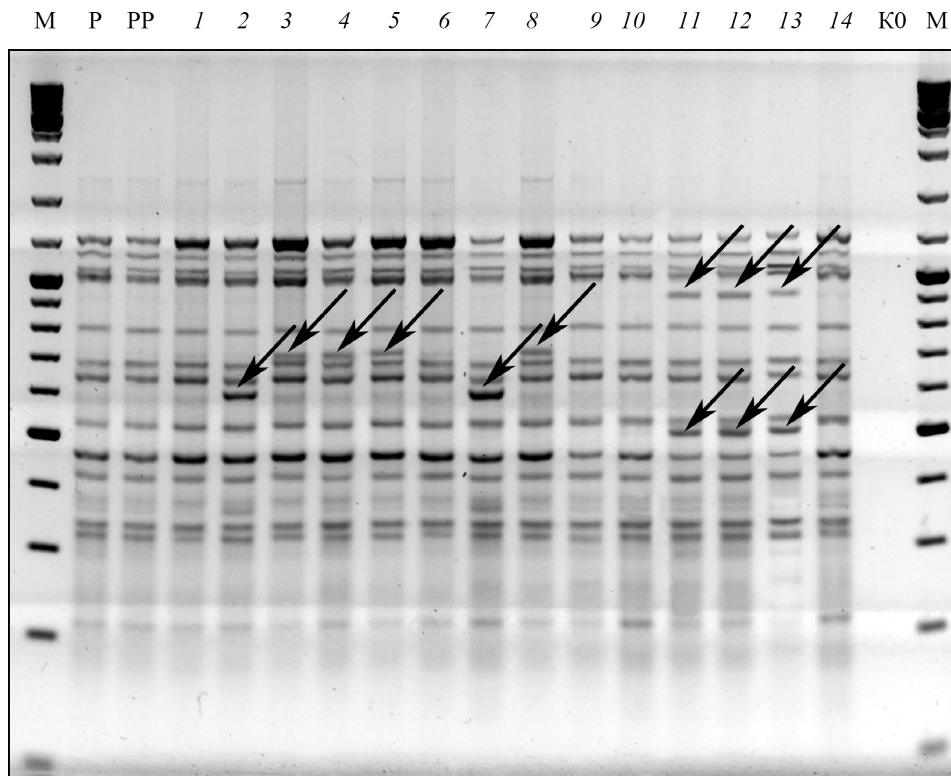


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймера Su. Тут і на рис. 4:

М — маркер молекулярних мас (GeneRuler DNA Ladder Mix); P — рослина вихідного сорту; PP — рослина-регенерант, отримана без трансформації; 1–14 — генетично модифіковані рослини; K0 — негативний контроль (TE-буфер)

спектр продуктів ампліфікації ДНК залежно від використаного праймера складався з 7–16 фрагментів розміром від 305 до 1517 пн.

Наступним етапом роботи було виявлення поліморфізму ДНК в геномі трансгенних рослин пшениці, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*. Для цього застосову-

Таблиця 2. Розмір ампліконів у спектрах продуктів ампліфікації ДНК досліджених зразків за використання різних праймерів

Праймер	Ретротранспозон	Кількість ампліконів, шт.	Розмір ампліконів, пн
Su	Sukkula	16	305, 338, 415, 458, 507 , 525 623 , 667, 682, 697 , 780, 920 , 1050, 1079, 1147, 1289
Su/Ni	Sukkula, Nikita	10	410, 475, 491, 573, 594 , 622, 679, 1033, 1081, 1214
Su/Sa	Sukkula, Sabrina	7	412, 473, 492, 621, 911, 1225, 1517
Wh/Sa	Wham, Sabrina	4	419, 627 , 863 , 1143

Примітка. Півжирним шрифтом виділено поліморфні амплікони.

вали праймери, що були ефективними на контрольних рослинах. Найінформативнішим виявилось застосування праймера до ретротранспозону Sukkula (рис. 2). Так, із цим праймером у спектрі продуктів ампліфікації ДНК отримали чотири нові амплікони: 507, 623, 697 та 920 пн (табл. 2) у дев'яти досліджених рослин. Ці дані свідчать про дванадцять незалежних подій транспозиції ретротранспозону Sukkula у трансформантах. За використання інших праймерів поліморфізму не виявлено.

Згідно з літературними даними, клітини, в яких є активні мобільні елементи, генетично більш нестабільні, ніж ті, в яких ці ділянки геному неактивні [13]. У дев'яти трансформантів виявлено появу нових, відносно низькомолекулярних (завдовжки менш як 1000 пн або близько до того) ампліконів. Поява кількох нових ампліконів, а також те, що вони містились у дев'яти з чотирнадцяти досліджених рослин, може вказувати на відносно високу частоту подій транспозиції у ДНК трансгенних форм.

Оскільки нові фрагменти ДНК виявлено в більшості досліджуваних форм і вони відсутні в контрольних рослин, це може свідчити про те, що індукція транспозиції ретротранспозону Sukkula у трансформантах можливо зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК, або стресом, безпосередньо пов'язаним із процесом трансформації (мікропоранення, кокультивування з *Agrobacterium*, культивування на селективних середовищах).

Комбінуванням різних IRAP-праймерів можна збільшити число досліджуваних локусів. Згідно зі схемою IRAP-аналізу, запропонованою Календарем, Шульманом [20], амплікони синтезуються в локусах, розміщених між інвертованими ретротранспозонами, та в локусах між одиничним LTR («solo-LTR») і ретротранспозоном (рис. 3, а). Тому для розширення спектра ампліконів у продуктах ПЛР досліджуваних зразків ми випробували методику поєднання IRAP-праймерів до різних ретротранспозонів в одній реакції (див. рис. 3, б). Ефективність такого підходу ми підтвердили при IRAP-аналізі рослин-регенерантів тритикале, отриманих шляхом клітинної селекції на стійкість до водного дефіциту, де за використання пари IRAP-праймерів Su/Ni виявлено транспозицію МГЕ [1].

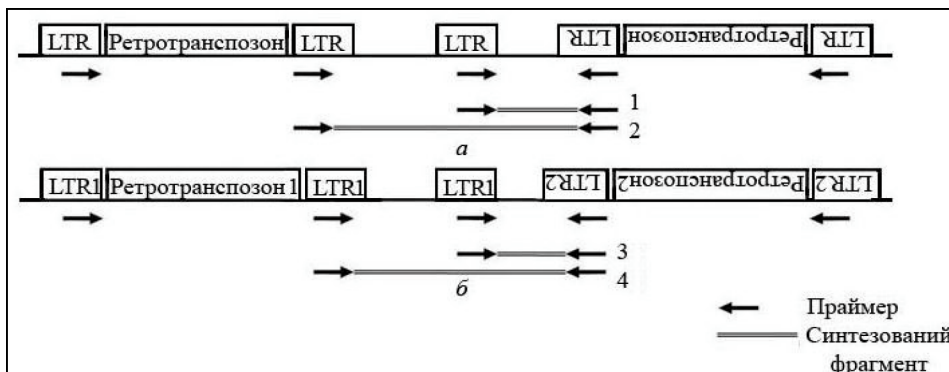
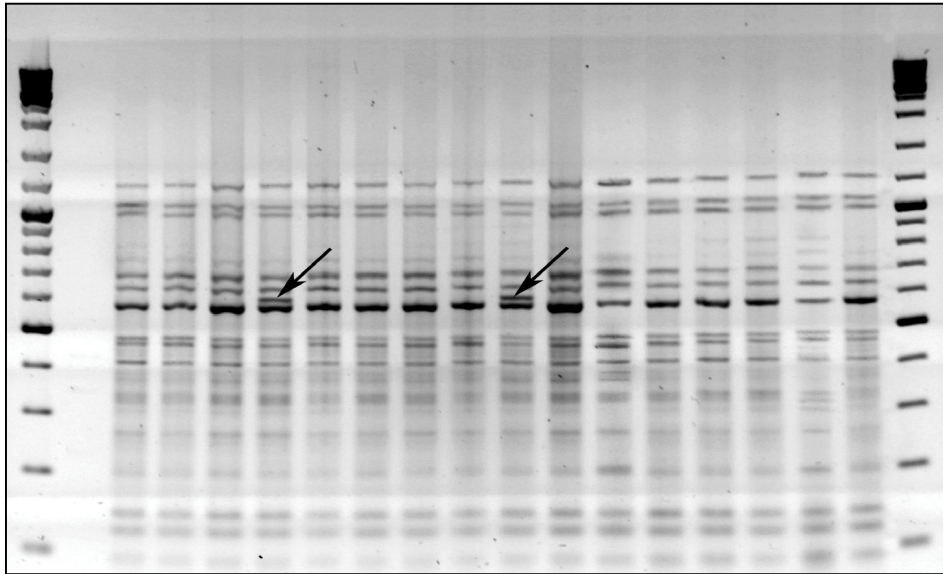


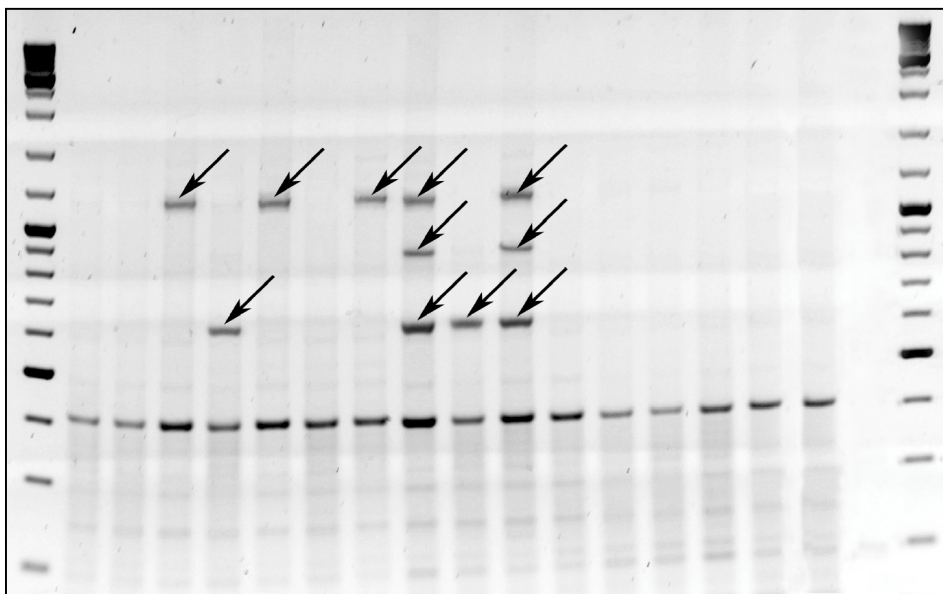
Рис. 3. Схема синтезу фрагментів ДНК (ампліконів), запропонована Календарем, Шульманом [20], за використання одного (а) та комбінації двох (б) IRAP-праймерів (власна розробка)

М К0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 Р РР М



a

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 Р РР К0 М



б

Рис. 4. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймерів Su/Ni (*a*) та Wh/Sa (*б*)

У ході дослідження ми експериментально підібрали пари IRAP-праймерів, за використання яких у спектрах продуктів ПЛР виявлялися поліморфні амплікони. Найінформативнішими були комбінації Su/Ni та Wh/Sa. В першому випадку з'явився один, у другому — три нові поліморфні амплікони (рис. 4).

На думку Байрама та співавт. [8], причиною явищ такого роду є транспозиція ретротранспозонів. Відповідно, виявлений нами амплікон розміром 594 пн за використання праймерів Su/Ni та ампліконів розміром 627, 863 і 1143 пн за використання праймерів Wh/Sa свідчать про активацію й транспозицію Sukkula/Nikita та Wham/Sabrina в геномі генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*.

Відомо, що в процесі сумісної еволюції сформувались механізми, які захищають геном хазяїна від чужорідної транспозиції, зокрема описано її пригнічення на транскрипційному (сайленсинг метилуванням ДНК) та посттранскрипційному (сайленсинг за рахунок РНК-інтерференції) рівнях [11, 25]. Тому за звичайних умов активність ретротранспозонів відсутня або незначна [13, 33].

За умов проведення експерименту ми не зареєстрували зникнення ампліконів у ДНК-профілях ПЛР, що може свідчити про відсутність перебудов у сайтах зв'язування з праймером та в досліджуваних локусах, фланкованих LTR ретротранспозонів. Слід зазначити, що в літературних джерелах описана транспозиційна активність ретротранспозонів *Tos 17* у трансформованих рослин рису [34] та *Tag1* у арабідопсису [10]. Автори також зазначили відсутність такої активності у контрольних рослин. Хоча застосований нами метод не дає змоги безпосередньо виявити транскрипційну активність ретротранспозонів, однак він може бути швидким та ефективним інструментом дослідження змін геному за генетичної трансформації й підтвердження транспозиції МГЕ.

Оскільки в ході дослідження ми встановили, що поліморфні амплікони найчастіше мали розмір менший за 1000 пн, однією з переваг застосування комбінації праймерів є те, що в спектрах продуктів ПЛР більшість отриманих фрагментів були відносно низькомолекулярними.

Експериментальні дані, отримані на пшениці, свідчать, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію ретротранспозонів Sukkula та Sukkula/Nikita, Wham/Sabrina, оскільки в контрольних рослин, отриманих у культурі *in vitro*, їх активність не виявлена. Разом з тим транспозиція МГЕ може свідчити про певну нестабільність геному трансгенних рослин, бо при цитологічному дослідженні ми встановили, що трансгенні форми цитогенетично більш нестабільні порівняно з нетрансгенними рослинами [4].

Отже, ми проаналізували рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозонів, у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять ген орнітин-амінотрансферази. Найрезультативнішим було застосування праймера до ретротранспозону Sukkula, де в спектрі продуктів ампліфікації отримали чотири нові амплікони: 507, 623, 697 та 920 пн, що свідчить про дванадцять незалежних подій транспозиції цього ретротранспозону в трансформантах. Поява кількох нових ампліконів, а також те, що їх було виявлено у дев'яти з чотирнадцяти досліджених рослин, може вказувати на відносно високу частоту подій транспозиції у трансгенних форм пшениці. Отримані дані свідчать, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію ретротранспозонів Sukkula та Sukkula/Nikita, Wham/Sabrina, оскільки в контрольних рослин, отриманих у культурі *in*

in vitro, їх активність не встановлена. Виявлений генетичний поліморфізм також може свідчити про загальну нестабільність геному деяких трансгенних форм.

1. Бавол А.В., Великожон Л.Г., Пикало С.М., Дубровна О.В. IRAP-аналіз рослин-регенерантів тритикале, стійких до водного дефіциту // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць. — К.: Логос. — 2016. — **19**. — С. 73–78.
2. Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур // Там само. — 2014. — **15**. — С. 16–19.
3. Бавол А.В., Дубровна О.В., Моргул Б.В. Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці // *Biotechnol. Acta*. — 2013. — **6**, № 6. — С. 113–119.
4. Бавол А.В., Лялько І.І., Воронова С.С. та ін. Перебіг мейозу в генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації // Физиология растений и генетика. — 2015. — **47**, № 6. — С. 536–544.
5. Боронникова С.В., Календарь П.П. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений // Генетика. — 2010. — **46**, № 1. — С. 44–50.
6. Цветков И.А., Иванов А.Н., Глазко В.И. Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP-маркерам // Изв. ТСХА. — 2006. — **4**. — С. 155–159.
7. Abdul R., Ma Z., Wang H. Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.): A review // *Triticeae Genomics and Genetics*. — 2010. — **1**, N 2. — P. 1–7.
8. Vayram E., Yilmaz S., Hamat-Mecbur H. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant OMICS*. — 2012. — **5**, N 3. — P. 211–217.
9. Bento M., Pereira H.S., Rocheta M. et al. Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: Sequence rearrangements in triticale // *PLoS One*. — 2008. — **3**, N 1. — P. 1402.
10. Bhatt A.M., Lister C., Crawford N., Dean C. The transposition frequency of *Tag1* elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines // *Plant Cell*. — 1998. — **10**. — P. 427–434.
11. 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. — **311**. — P. 1–11.
12. 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. — **64**. — P. 145–157.
13. 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. — **22**, N 6. — P. 1686–1701.
14. Clive J. Global status of commercialized biotech // *GM Crops*. — 2011. — ISAAA Brief. — N 43. — P. 1–8.
15. Filleur S., Dorbe M.F., Cerezo M. An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake // *FEBS Lett.* — 2001. — **489**, N 2–3. — P. 220–224.
16. Flugge U.I., Klosgen R.B. Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor at Toc33 from chloroplasts // *Mol Genet Genomics*. — 2004. — **272**, N 4. — P. 379–396.
17. Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // *Plant Growth Regul.* — 2002. — **37**. — P. 263–285.
18. Gaspar Y.M., Nam J., Schultz C.J. Characterization of the *Arabidopsis* lysinerich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation // *Plant Physiol.* — 2004. — **135**, N 4. — P. 2162–2171.
19. Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — **98**, N 5. — P. 704–711.
20. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature protocols*. — 2006. — **1**, N 5. — P. 2478–2484.
21. Kidwell M.G., Lisch D.R. Hybrid genetics. Transposons unbound // *Nature*. — 1998. — **393**. — P. 22–23.
22. Kidwell M.G., Lisch D.R. Transposable elements and host genome evolution // *Trends Ecol. Evol.* — 2000. — **15**. — P. 95–99.

23. Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. — 1999. — 33. — P. 479—532.
24. Leonard J.M., Bollmann S.R., Hays J.B. Reduction of stability of *Arabidopsis* genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function // Plant Physiol. — 2003. — 133, N 1. — P. 328—338.
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. — 133. — P. 523—536.
26. Lu B.R., Snow A.A. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences // BioSci. — 2005. — 55. — P. 669—678.
27. Matzke A.J.M., Matzke M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes // Curr. Opin. Plant Biol. — 1998. — 1. — P. 142—148.
28. 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. — 43. — P. 401—415.
29. Muller K., Heller H., Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genome // J. Biol. Chem. — 2001. — 276. — P. 14271—14278.
30. Pasquali M., Dematheis F., Gullino M.L., Garibaldi A. Identification of Race 1 of *Eusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique // Phytopathology. — 2007. — 97, N 8. — P. 987—996.
31. Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant-genome evolution // Biotechnology and Biotechnological Equipment. — 2007. — N 21. — P. 294—305.
32. Trebichalsky A., Kalendar R., Schulman A. et al. Detection of genetic relationships among spring and winter triticale (*Triticosecale* Witt.) and rye cultivars (*Secale cereale* L.) by using retrotransposon-based markers // Czech. J. Genet. Plant Breed. — 2013. — 49. — P. 171—174.
33. Vicent C.M. Transcriptional activity of transposable elements in maize // BMC Genomics. — 2010. — 11, N 601. — P. 1—10.
34. 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. — 28, N 7. — P. 1043—1051.

Отримано 12.12.2016

ИРАР-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ,
ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
IN VITRO

О.В. Дубровная, А.Н. Гончарук, Л.Г. Великожон

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Проанализированы уровень полиморфизма участков ДНК, фланкированных инвертированными LTR повторами ретротранспозонов, у генетически модифицированных растений пшеницы, полученных методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в культуре *in vitro*, содержащих ген орнитинаминотрансферазы. Наиболее результативным было применение праймера к ретротранспозону Sukkula, где в спектре продуктов амплификации ДНК получены четыре новых ампликона у девяти изученных растений. Эти данные подтвердили, что именно инсерция чужеродной ДНК способна индуцировать транспозицию ретротранспозонов Sukkula/Nikita и Wham/Sabrina, поскольку у контрольных растений, полученных в культуре *in vitro*, их активность не установлена.

IRAP-ANALYSIS OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT PLANTS OBTAINED BY
AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION IN VITRO

O.V. Dubrovna, O.M. Goncharuk, L.G. Velikozhon

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

The polymorphism of DNA regions, flanked by inverted repeats LTR retrotransposons, in genetically modified wheat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation in vitro comprising ornithine aminotransferase gene has been analyzed. The most effective was the use of primer to the retrotransposon Sukkula, where the spectrum of DNA amplification products revealed four new amplicons in nine plants studied. The findings suggest that it is the insertion of foreign DNA capable of inducing transposition of retrotransposons Sukkula/Nikita and Wham/Sabrina, because in control plants derived from in vitro culture their activity has not been established.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, retrotransposons, IRAP-PCR.