

УДК 633.63/577.213.3

Присяжнюк Л. М., Сігалова І. О., Шкляр В. Д.

Український інститут експертизи сортів рослин, вул. Генерала Родимцева, 15,
м. Київ, 03041, Україна, e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net

ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ДІЇ ГЛІФОСАТУ

Сучасний селекційний процес цукрових буряків ґрунтується на використанні методів гібридної селекції, тому актуальним є розробка ефективного методу ідентифікації трансформантів, який дозволить значно прискорити та підвищити ефективність проведення добору серед різних генотипів цукрових буряків з метою створення гібридів з новими ознаками, зокрема із толерантністю до дії гліфосату. Метою досліджень було створити мультиплексну систему ідентифікації толерантних до гліфосату буряків за допомогою ПЛР.

Досліджувані диплоїдні гібриди були отримані на Ялтушківській дослідно-селекційній станції в лабораторії селекції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН шляхом гетерозисної селекції на основі чоловічостерильних ліній та багатонасінного запилювача, який містить ген, що обумовлює толерантність до дії гліфосату. Матеріалом для роботи були шість гібридів по 30 генотипів кожного для одного аналізу.

Виділення ДНК проводили згідно модифікованої нами методики на основі методу, розробленого Дрейпером та ін. (1991) з використанням катіонного детергенту ЦТАБ із частини листової пластини.

Для виявлення частин генетичної конструкції у трансгенних рослин цукрових буряків використовували метод ПЛР з подальшим електрофоретичним розділенням продуктів реакції. Для підбору параметрів ПЛР, визначення оптимальних концентрацій компонентів реакційної суміші спочатку проводили серії моноплексних реакцій, а потім на основі отриманих даних здійснювали дослідження із розробки мультиплексної системи.

Для ідентифікації гена *ср 4 epsps* (ген інтересу), промоторної ділянки генетичної конструкції (промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти) в рослинах цукрових буряків проводили реакцію ампліфікації з праймерами специфічними до цільових послідовностей. В якості внутрішнього стандарту використовували ген ацетолактатсинтетази (*als*) цукрових буряків.

Для ідентифікації структурних елементів генетичної конструкції та цільових генів з метою відбору генотипів, які містять усі елементи конструкції, проводили ПЛР із специфічними праймерами окремо для кожної з досліджуваних послідовностей ДНК. У подальшому цей матеріал використовували при розробці мультиплексної системи.

Після проведення електрофорезу продуктів ампліфікації під УФ-світлом на агарозному гелі були виявлені амплікони розміром 195 п. н., що відповідають послідовності 35S промотора, амплікони розміру 1132 п. н., що вказують на послідовності гена *ср 4 epsps*.

Значення температур гібридизації різнилися для різних праймерів: 50 °C для виявлення гена внутрішнього контролю (ген *als*) та 55 °C для праймерів, які дозволяють ідентифікувати послідовності 35S промотору та гена інтересу, тому для ідентифікації гена ацетолактат синтази цукрових буряків ПЛР проводили, використовуючи термоцикли з температурою гібридизації 55 °C. У результаті електрофорезу в агарозному гелі були виявлені амплікони розміром 840 п. н., що відповідають послідовності гена внутрішнього контролю та співпадають з фрагментами, які були отримані за допомогою ампліфікації з даними праймерами за температури гібридизації 50 °C.

За результатами досліджень, отримані амплікони очікуваного розміру на треках, що відповідають зразкам, ампліфікацію ДНК яких проводили за температури гібридизації 55 °C. В проведених моноплексних реакціях для ідентифікації гена *als* підвищення температури на 5 °C не вплинуло на можливість визначення гена внутрішнього контролю цукрових буряків, оскільки розміри ампліконів збіглися за однакових інших параметрах реакції та концентрації компонентів. При застосуванні в якості матриці для ампліфікації ДНК нетрансформованого гібрида з температурою гібридизації праймерів 55 °C були отримані амплікони розміром 840 п. н., що свідчить про високу консервативність даної послідовності та можливість використання її в мультиплексній реакції.

Аналіз даних, отриманих за результатами проведених ПЛР, дозволив визначити оптимальні параметри роботи розробленої мультиплексної тест-системи: 1 крок (початкова денатурація) 95 °C – 3 хв.; 2-й (напрацювання специфічних продуктів реакції): денатурація 95 °C – 45 с; гібридизація праймерів 55 °C – 50 с; елонгація 72 °C – 1 хв; кількість циклів – 40; 3-й крок (кінцева елонгація) 72 °C – 6 хв.

Оскільки для ідентифікації цільових послідовностей при проведенні моноплексних реакцій концентрації праймерів, дНТФ та іонів Mg²⁺ були різними, то для проведення мультиплексної реакції в процесі роботи були підібрані оптимальні концентрації компонентів для виявлення трансгенних цукрових буряків толерантних до гліфосату. Об'єм реакційної суміші становив 20 мкл.

Наступним етапом у наших дослідженнях було визначення оптимальної кількості матриці ДНК для ефективною оцінки трансгенних рослин цукрових буряків за наявністю специфічних послідовностей. Для проведення мультиплексної реакції використовували сумарну ДНК, отриману з трансгенної рослини цукрових буряків з різною концентрацією. Препарати ДНК тестували після серії послідовних розведень: 50 нг, 100 нг, 150 нг, 200 нг.

При застосуванні в ПЛР 50 нг ДНК відбувалось напрацювання невеликої кількості продуктів реакції, про що свідчить менш інтенсивний сигнал на відповідному треку електрофореграми. Після збільшення кількості матриці до 100 нг та 150 нг було отримано достатню кількість продуктів ампліфікації, що дозволяє встановити наявність цільових послідовностей у цих зразках. У зразку з 200 нг досліджуваної ДНК відмічено наявність невеликої кількості неспецифічних продуктів ампліфікації розмірами від 200 до 800 п. н. та

значне перевантаження нуклеїновими кислотами. Отже, для ідентифікації елементів трансгенної конструкції в рослинах цукрових буряків за використання розробленого мультиплексного підходу доцільно застосовувати 100–150 нг сумарної ДНК на одну реакцію. Прийнятним також є і 50 нг, проте існує ймовірність отримання хибно негативних результатів унаслідок невеликої кількості матриці для ампліфікації.

Таким чином, нами була розроблена мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція з системою праймерів гомологічних до послідовностей 35S промотора, гена *cp 4 epsps* та гена внутрішнього контролю цукрових буряків (*als*), яка дозволяє мінімізувати кількість реактивів та рослинного матеріалу для проведення аналізу, а також скоротити час для досліджень великої кількості зразків. Для проведення мультиплексної ПЛР із визначення толерантних до дії гліфосату цукрових буряків реакційна суміш має містити (кінцеві концентрації): праймери до 35S промотору – по 0,5 мкМ, праймери до гену *cp 4 epsps* – по 1 мкМ; до гену *als* – по 0,2 мкМ; дНТФ – 200 мкМ; 1^х сольовий буфер; 2 мМ MgCl₂; 1 од. Taq-полімераза, а також наступні значення температурних режимів: 1 крок (початкова денатурація) 95 °С – 3 хв; 2-й (напрацювання специфічних продуктів реакції): денатурація 95 °С – 45 с; гібридизація праймерів 55 °С – 50 с; елонгація 72 °С – 1 хв; кількість циклів – 40; 3-й крок (кінцева елонгація) 72 °С – 6 хв.

Розроблений підхід до ідентифікації елементів трансгенної конструкції, інтеграція якої в геном цукрових буряків забезпечує толерантність до дії гліфосату, дозволить проводити індивідуальну оцінку селекційного матеріалу цукрових буряків з метою отримання гібридів зі стабільним рівнем експресії трансгена.

УДК 581.526.34:332.32(477.41)

Якубенко Б. Є.¹, Чурілов А. М.¹, Якубенко Н. Б.²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Генерала Родимцева, 19, м. Київ, 03041, Україна,

²Український інститут експертизи сортів рослин, вул. Генерала Родимцева, 15, м. Київ, 03041, Україна

ІНВАЗІЇ ЧУЖОРІДНИХ ВИДІВ – БІОЛОГІЧНА ЗАГРОЗА ГЕНЕТИЧНИМ РЕСУРСАМ ФІТОРІЗНОМАНІТТЯ ЛУКІВ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Нині, однією із найактуальніших екологічних проблем не тільки України, але на світовому рівні визнано проблему біологічного забруднення довкілля за рахунок інвазії чужорідних видів. У зв'язку з цим країнами-партнерами Ради Європи розроблено ряд стратегічних документів та національних переліків видів з високою інвазійною здатністю, таких як A Global Strategy on Invasive Alien Species (Mc Neely et al., 2001) тощо. Тим часом, законодавством України – Закони України «Про карантин рослин», (30.06.1993 р. № 3348-XXII), «Про основні засади (стратегію) державної екологічної політики України на період до 2020 року» (№ 2818-IV, 21.12.2010), передбачено

Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку