

Анотація

Кляченко О. Л., Лиханов А. Ф., Крыловская С. А.

Особенности состава тритерпеновых сапонинов и фенольных веществ в листьях различных генотипов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*

*В результате исследований по изучению состава тритерпеновых сапонинов и фенольных веществ в сорте, ди- и триплоидных гибридах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) проанализирован их количественный и качественный состав. Обсуждаются перспективы использования тритерпеновых сапонинов в качестве маркеров для диагностики продуктивности и адаптивности растений.*

Ключевые слова: тритерпеновые сапонины, фенольные вещества, культура *in vitro*, сахарная свекла

УДК 631.52:606.6:633.63

Л.М. КОЖЕМЯКИНА, аспірант

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

E-mail: kozhemyakina_1@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ СТРУКТУРНИХ ЧАСТИН ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Наведені результати досліджень по ідентифікації промоторних і термінаторних ділянок генетичних конструкцій та гену стійкості до гліфосату методом полімеразної ланцюгової реакції.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, 35S-промотор, NOS-термінатор, *ср4 EPSPs* ген

Вступ. При створенні трансгенних рослин та їх впровадженні в сільське господарство як комерційних культур найбільш важливим є досягнення високого і стабільного рівня експресії перенесених корисних генів. Проблема «замовкання генів» має велике практичне значення в селекційній роботі при отриманні гібридних форм рослин, тому що у генетично модифікованих сільськогосподарських культур всі корисні гени повинні функціонувати стабільно [2]. Зокрема, стабільність генетичних конструкцій в геномі цукрових буряків та їх експресія є мало вивченим питаннями, тому актуальним є з'ясування ефективності прояву трансгенів в рослинах цукрових буряків [5].

Метою досліджень є ідентифікація промоторних, термінаторних елементів генетичних конструкцій та корисних генів в трансгенних рослинах цукрових буряків за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали та методи. В роботі використовували селекційний матеріал цукрових буряків, який містить генетичну конструкцію з геном стійкості до гліфосату, що є діючою речовиною комерційного препарату *Roundup*. Досліджувана генетична конструкція включає послідовність 35S промотору, NOS термінатору та *ср4 EPSPs* гену. Для досліджень було відібрано чотири зразки трансгенних рослин цукрових буряків, а також один контрольний зразок, що не містив трансгену.

Виділення ДНК проводили згідно методики розробленої Дж. Дрейпером та ін. (1991 р.) [1]. Заморожені листки трансгенних рослин цукрових буряків (по 500 мг кожного зразку) розтирали в охолодженій ступці з додаванням лізуючого буферу, що містив катіонний детергент ЦТАБ різних концентрацій для утворення нерозчинного комплексу нуклеїнових кислот. При видаленні білків застосовували обробку розчином: хлороформ-ізоаміловий спирт у співвідношенні 24:1. Осадження та концентрування ДНК проводили додаючи розчин 96% етилового спирту. Отриманий осад розчиняли в 50 мкл ТЕ-буферу.

Для виявлення промоторних ділянок генів генетичних конструкцій в рослинах цукрових буряків використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим

електрофоретичним розділенням продуктів реакції [4]. В дослідженнях використовували набір реактивів для детекції генетично модифікованих організмів методом ПЛР *GenPac GMO-35S PCR test* (ООО «Лаборатория Изоген», Росія). Ампліфікацію ДНК проводили за наступною програмою: денатурація 95°C – 60 сек.; гібридизація праймерів 58°C – 40 сек.; елонгація – 74 °C – 60 сек., 45 циклів. Продукти реакції ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5% агарозному гелі при напрузі 150 В протягом 30 хв. з бромистим етидієм. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили під ультрафіолетовим світлом з довжиною хвилі 321 нм.

Для ідентифікації термінаторних ділянок генів генетичних конструкцій та корисних генів в рослинах цукрових буряків проводили ПЛР в реальному часі [3]. В роботі використовували мультиплексну тест систему, яка включала праймери та флуорисцентні зонди для виявлення *NOS* термінатору та *cp4 EPSPs* гену («Синтол», Росія) [2; 6]. Параметри реакції ампліфікації: початкова денатурація 95°C – 5 хв.; денатурація 95°C – 15 сек.; гібридизація праймерів 61°C – 40 сек., 45 циклів.

Результати досліджень. В процесі роботи були проаналізовані зразки трансгенних рослин цукрових буряків толерантні до гліфосату, що містять в складі генетичної конструкції *35S* промотор, *NOS* термінатор та корисний ген. Для детекції промоторної послідовності продукти реакції ампліфікації розділяли в агарозному гелі. По наявності фрагменту ампліфікації розміром 194 п.н. робили висновок присутність *35S* промотору в матеріалі, що аналізується (рис. 1).

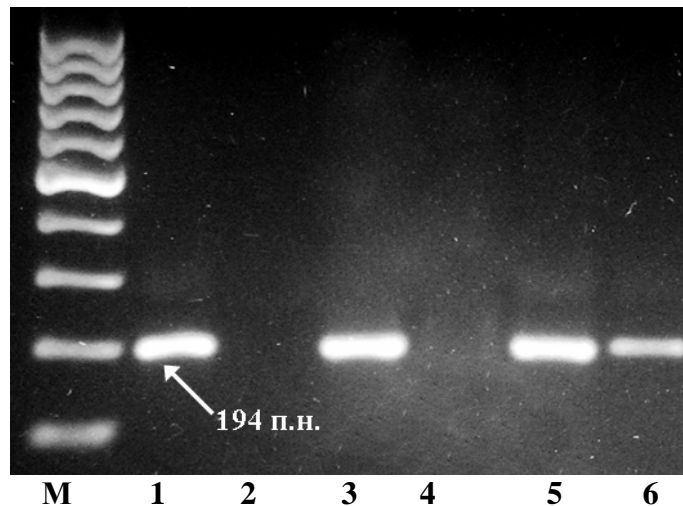


Рис. 1. М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler™ 100bp*); 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3, 4, 5, 6 – досліджувані зразки ДНК.

В результаті електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації в агарозному гелі, було встановлено наявність ампліконів розміром 194 п.н., що відповідають послідовності *35S* промотору в контрольному позитивному зразку та їх відсутність на треку негативного контролю, що дозволило зробити висновок про достовірність отриманих даних та відсутність контамінації. Наявність ампліконів зазначеного розміру на треках №3, 5, 6 свідчить про присутність *35S* промоторної ділянки в зразках Тр3/1, Тр3/2, Тр3/3, що відповідають даним трекам.

Результатом ПЛР-аналізу у реальному часі є графік флюоресценції досліджуваних зразків (рис. 2) та цифрові дані порівняння графіків накопичення ДНК (рис. 3).

На рисунку 2. відображено процес отримання цільових фрагментів *NOS* термінатору та *cp4 EPSPs* гену, а також значення порогової величини, що знаходиться на рівні 22,63 циклу. На графіку накопичення продуктів ампліфікації для досліджуваних зразків можна виділити три ділянки: ділянку «шумів», «експоненціальну» ділянку і ділянку «плато». Визначення числових значень порогового циклу накопичення продукту реакції ампліфікації проводили на експоненціальному інтервалі, тому що на даній ділянці ефективність реакції близька до максимальної у всіх зразках.

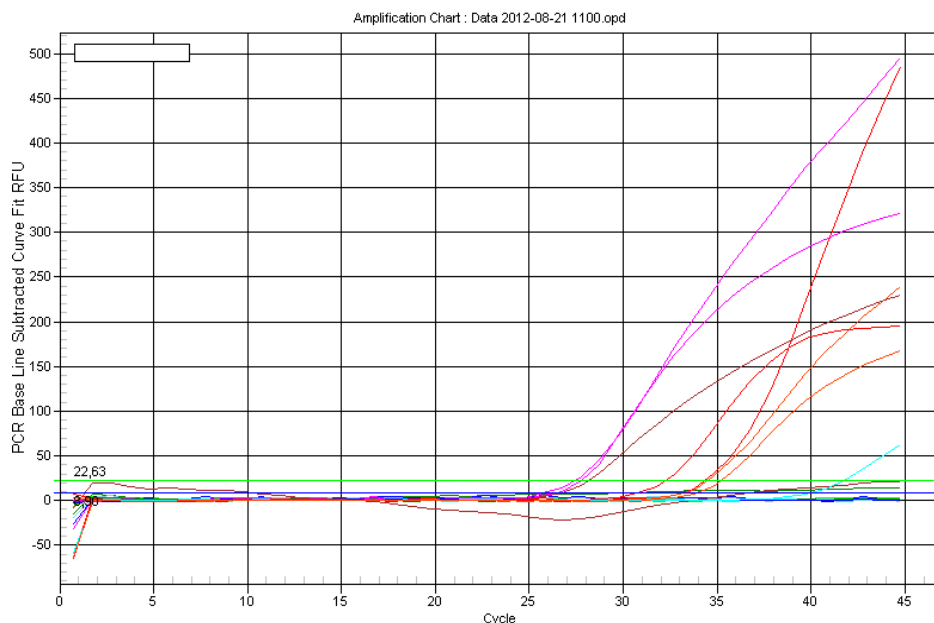


Рис. 2. Графік накопичення ДНК для зразків трансгенних рослин цукрових буряків.

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
B02	FAM	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B03	FAM	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	FAM	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B06	FAM	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	FAM	Pos Ctrl	ПК	1	27,75	27,75	N/A	N/A
B09	FAM	Pos Ctrl	ПК	1	27,05	00,00	N/A	N/A
F02	FAM	Unkn	Tr3/3	3	N/A	00,00	N/A	N/A
F05	FAM	Unkn	Tr3/2	4	34,55	34,55	N/A	N/A
F08	FAM	Unkn	Tr3/1	5	34,63	34,63	N/A	N/A
B02	Cy5	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B03	Cy5	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	Cy5	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B06	Cy5	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	Cy5	Pos Ctrl	ПК	1	26,34	26,48	0,192	N/A
B09	Cy5	Pos Ctrl	ПК	1	26,61	26,48	0,192	N/A
F02	Cy5	Unkn	Tr3/3	3	39,98	39,98	N/A	N/A
F05	Cy5	Unkn	Tr3/2	4	30,80	30,80	N/A	N/A
F08	Cy5	Unkn	Tr3/1	5	33,89	33,89	N/A	N/A

Рис. 3. Числові дані порівняння графіків накопичення продуктів ампліфікації для трьох зразків рослин цукрових буряків

Отримані дані (рис. 3) свідчать про присутність послідовностей ДНК *NOS* термінатору у двох зразках Tr3/2 та Tr3/1 (порогові цикли за каналом флюорисценції *FAM* (карбоксифлуоресцеїн) – тридцять четвертий) та *cp4 EPSPs* гену в трьох зразках Tr3/3, Tr3/2, Tr3/1 (порогові цикли за каналом флюорисценції *Cy5* – тридцять дев'ятий, тридцятий та тридцять третій) (рис.3).

В результаті проведених досліджень було проаналізовано п'ять зразків рослин цукрових буряків, в тому числі один контрольний зразок, що не містить трансгену.

Висновки. Отримані дані свідчать, що у всіх проаналізованих зразках виявлено ген *cp4 EPSPs*, що обумовлює толерантність до гліфосату. Зразки Tr3/1 та Tr3/2 мали всі складові генетичних конструкцій, що нас цікавили (*35S* промотор, *NOS* термінатор та *cp4 EPSPs* ген). В зразку Tr3/3 була відсутня термінаторна послідовність, контрольний нетрансгенний зразок не містив досліджуваної конструкції. Таким чином, склад компонентів перенесеної конструкції в досліджуваних зразках трансгенних рослин цукрових буряків дає змогу провести оцінку ефективності експресії корисних генів.

Список використаних літературних джерел

1. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. / [под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена]. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
2. Епринцев А.П. Идентификация и исследование экспрессии генов / Епринцев А.П., Попов В.Н., Федорин Д.Н. – Воронеж, 2008. – 64 с.
3. ПЦР «в реальном времени» / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.]; под ред. Д.В. Ребриков. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
4. Роїк М. В. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду ВЕТА L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Роїк М.В., Сиволап Ю.М., Петюх Г.П., Шаюк Л.В., Баб'яж А.І., Білоус Н.В., 2007. – 27 с.
5. Тищенко Е.Н. Метилирование ДНК и экспрессия генов растений / Е.Н. Тищенко, В.И. Кунцевич // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. - № 3. – С. 213 – 227.
6. Dörries H.-H. Multiplex GMO Screening: a Unique 4-Target Real-Time PCR / H.-H. Dörries, I. Remus, A. Grönewald, C. Grönewald, C. Harzman, Berghof-Jäger // Anal Bioanal Chem. – 2010. – Vol. 396(6). – №3. – P. 2043–2054.

Аннотация

Кожемякина Л. М.

Идентификация структурных частей генетических конструкций в трансгенных растениях сахарной свеклы

Приведены результаты исследований по идентификации промоторных и терминаторных участков генетических конструкций и гена устойчивости к глифосату методом полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, 35S-промотор, NOS-терминатор, cp4 EPSPs ген

Annotation

Kozhemiakina L.

Identification of the structural parts of the genetic constructs in transgenic sugar beet

The results of studies to identify the promoter and terminator regions of genetic constructs and glyphosate resistance gene by polymerase chain reaction.

Keywords: polymerase chain reaction, 35S promoter, NOS terminator, gene cp4 EPSPs