

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ ПРОМОТОРНИХ ДІЛЯНОК ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

*В статті наведені результати досліджень по виділенню загальної ДНК з трансгенних рослин цукрових буряків та ідентифікації генів промоторних ділянок методом полімеразної ланцюгової реакції.*

**Вступ.** Швидке поширення аграрних технологій, в яких використовуються генетично модифіковані організми, є результатом не тільки бурхливого розвитку генетичноінженерних методів, а й ретельним вивченням проблеми успадкування корисних ознак та особливостей експресії перенесених генів. При практичному використанні трансгенних рослин стикнулися з явищем варіабельності в експресії перенесених генів [1] Подібна проблема має місце і при вирощуванні трансгенних рослин цукрових буряків, толерантних до дії гербіциду раундапу. Тому актуальним є дослідження стабільності генетичних конструкцій та з'ясування ефективності прояву нових генів в трансгенних рослинах цукрових буряків.

*Метою* проведених досліджень було підібрати методику виділення загальної ДНК з трансгенних рослин цукрових буряків та провести ідентифікацію певних ділянок генетичних конструкцій, зокрема, генів промоторних ділянок.

**Матеріали та методика досліджень.** В дослідженнях використовували рослини цукрових буряків отримані в лабораторії селекції ІБКЦБ НААН України шляхом гетерозисної селекції. Вихідний селекційний матеріал, толерантний до дії раундапу, містить анонімну генетичну конструкцію з геном стійкості до гліфосату. Це означає, що на дану конструкцію відсутня генетична карта. За літературним даними, будь яка генетична конструкція повинна включати промоторну ділянку для роботи гену інтересу. Для досліджень були відібрані п'ять зразків з трансгенних рослин цукрових буряків, які були вирощені в польових дослідах та оброблені гербіцидом раундапом: Тр1/2, Тр 3/3, Тр3/1, Тр1/1 і контрольний зразок НТр1/2, який не містив трансгену.

Виділення ДНК проводили згідно методики, оптимізованої в лабораторії новітніх аграрних біотехнологій ІЦБ УААН [5]. Заморожений рослинний матеріал у вигляді фрагмента листової пластини (500 мг) розтирали з 0,6 мл лізуючого розчину та поміщали в пробірки типу Eppendorf. Інкубували протягом 1 години при температурі 60°C. Додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), суспендували на вортексі протягом 2 хв.. Центрифугували протягом 4 хв. у мікроцентрифузі при 11000 g. Повторили очистку матеріалу сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт. Додавали охолоджений ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:0,6 та інкубували 20 хв. (18-20°C). Центрифугували протягом 20 хв. при 9000 g, а отриманий осад промивали додаванням 50 мкл 96% етилового спирту. Відібравши залишки спирту, осад висушували при температурі 18-20°C. ДНК розчиняли у 50 мкл ТЕ-буферу.

Паралельно проводили виділення ДНК згідно методики Дж. Дрейпера та ін. [2]. При цьому заморожені зразки рослинного матеріалу (500 мг) розтирали та переносили в пробірки типу Eppendorf. Додавали 500 мкл 2хЦТАБ (бромистого цетилтриметиламонію) (96°C), потім вносили 10 мкл меркаптоетанолу. Інкубували 20 хв. при 56°C та охолоджували до 18-20°C. Додавали рівний об'єм хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), суспендували на вортексі. Центрифугували протягом 2 хв. при 11000 g. Водну фазу відбирали в чисті пробірки і додавали 0,1 об'єму 10% ЦТАБ (56°C). Процедуру очищення хлороформом повторили. До відібраної водної фази додавали рівний об'єм 1% ЦТАБ та інкубували протягом 20-30 хв. при 18-20°C. Осаджували центрифугуванням при 2000 g протягом 15 хв.. Підсушений осад розчиняли в 400 мкл 1М NaCl. До отриманого розчину додавали 800 мкл охолодженого 96% етило-

вого спирту і залишали на ніч при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Осаджували центрифугуванням протягом 2 хв. при 9000 г. Осад промивали 65% та 85% розчинами етилового спирту тричі протягом 1 хв. Осад підсушили і розчиняли в 50 мкл ТЕ-буферу.

Визначення генів промоторних ділянок (в наших дослідах - промотору 35S мозаїки цвітної капусти) проводили з використанням набору реактивів GenPac GMO-35S PCR test. методом полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікацію ДНК проводили в ампліфікаторі AMPLY 4 біокот за наступною програмою: денатурація  $95^{\circ}\text{C}$  – 60 сек.; відпал праймерів  $58^{\circ}\text{C}$  – 40 сек.; елонгація –  $74^{\circ}\text{C}$  – 60 сек., 45 циклів [3].

**Результати досліджень.** Виділення загальної ДНК проводили з листків трансгенних рослин цукрових буряків, які були відібрані в польових умовах за фенотиповими ознаками. Для визначення найбільш ефективної методики проводили електрофорез в 0,8% агарозному гелі при напрузі 100 В протягом 20 хв. (рис. 1).

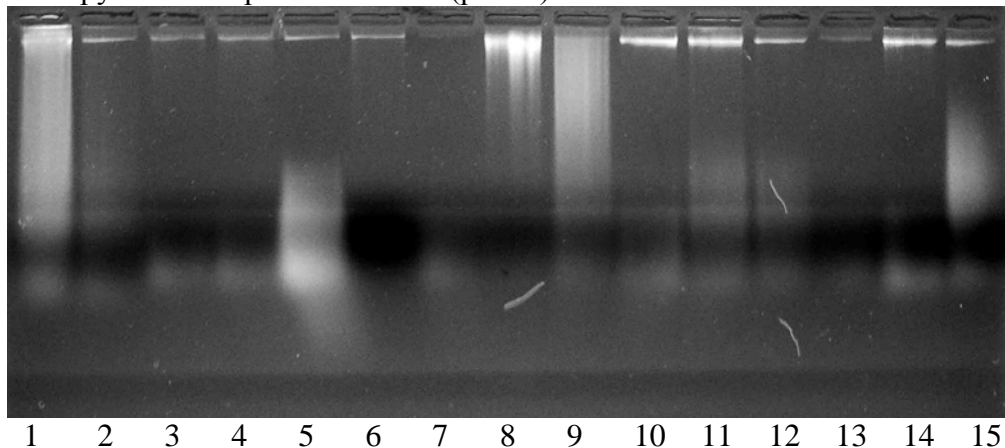


Рис. 1. Електрофорез препаратів ДНК:

1-9 – ДНК, виділена згідно з [2]; 10-15 – ДНК, виділена згідно з [5].

В результаті електрофоретичного розділення фрагментів ДНК, було встановлено, що обрані нами методики є ефективними для виділення ДНК з цукрових буряків. В той же час, при порівнянні кількості та якості препаратів ДНК в зразках, отриманих за цими методиками, є очевидним, використання методики [5] дає можливість отримати більш високомолекулярну ДНК в кожному зразку в достатній кількості для проведення молекулярних аналізів, тоді як методика [2] дозволяє отримати значно менші кількості ДНК та й ця ДНК є більш деградованою.

Продукти реакції ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5% агарозному гелі при напрузі 120 В на протязі 30 хв. з бромистим етидієм під ультрафіолетовим світлом з довжиною хвилі 321 нм (рис. 2). По наявності специфічного фрагменту ампліфікації розміром 194 п.н. робили висновок про наявність ДНК генетично модифікованих компонентів в матеріалі, що аналізується [4].

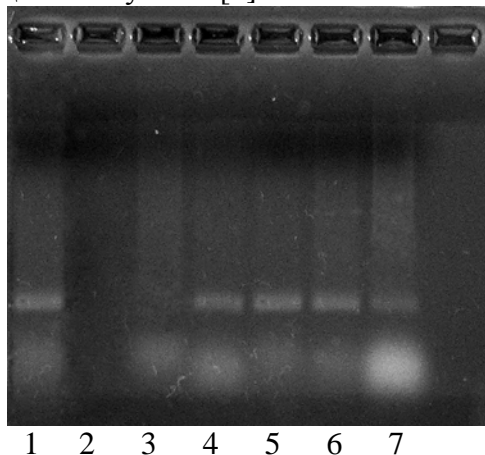


Рис. 2. Електрофорез продуктів ампліфікації

ДНК: 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3- зразок НТр1/2; 4-7 –зразки Тр1/2, Тр 3/3, Тр3/1, Тр1/1, відповідно.

При використанні в якості вихідного матеріалу нативної ДНК стандартного зразка генетично модифікованого продукту (позитивний контроль) на агарозному гелі після проведення електрофорезу продуктів ампліфікації під УФ-світлом на треку №1 присутній амплікон, що відповідає розміру 194 п.н. При використанні в якості негативного контрольного зразка на треку №2 відсутні будь-які амплікони, що означає відсутність ампліфікованого фрагменту. Подібна картина спостерігається також для треку №3, де було використано рослинний матеріал з не трансгенного зразка НТр1/2. Даний результат підтверджує факт відсутності вставки. Наявність ампліконів з розміром 194 п.н. на треках №4-7 свідчить про присутність в цих зразках гену промоторної ділянки генетичної конструкції, зокрема - 35S-промотору мозаїки цвітної капусти.

**Висновки.** Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що в зразках трансгенних рослин, взятих для аналізу, були ідентифіковані гени 35S промотору мозаїки цвітної капусти, які підтверджують припущення, що дані генетичні конструкції трансгенних цукрових буряків містять відповідну промоторну регуляторну область. Також, при проведенні досліджень було виявлено, що методика [5] є більш ефективною для виділення і очищення загальної ДНК з рослинного матеріалу трансгенних цукрових буряків.

#### Список використаних літературних джерел

1. Георгиев Г.П. Гены высших организмов и их экспрессия / Георгиев Г.П. – М.: Наука, 1989. – 324 с.
2. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: [под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена]. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона. – М.: Мир, 1999.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: Практическое пособие / Остерман Л.А. - М: Наука, 1981. - 288с.
5. 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.

*Аннотація.* В статті приведені результати досліджень по виділенню загальної ДНК із трансгенних рослин сахарної свекли та ідентифікації генів промоторних участків методом полімеразної ланцюгової реакції.

*Annotation.* Results to isolate of total DNA from transgenic sugar beet plants and identify of promoter regions by polymerase chain reaction were described.

УДК:633.14:631.527631.523.4:575.125

**М.О. КОРНЄЄВА**, кандидат біологічних наук

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

**З.О. МАЗУР**, кандидат с.-г. наук

Верхняцька ДСС ІБКіЦБ НААН України

#### ВИКОРИСТАННЯ ДІАЛЕЛЬНИХ СХРЕЩУВАНЬ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЛІНІЙ ОЗИМОГО ЖИТА

*У статті розглядаються результати генетичного аналізу ліній озимого жита. Виявлено кращі міжлінійні гібриди, одержані на основі використання діалельних схрещувань.*

**Вступ.** Процес створення високоврожайних сортів і гібридів озимого жита вимагає цілеспрямованого підбору і проведення певних схрещувань батьківських форм, від правильності яких залежить успіх гібридизації та вивчення генетичного контролю кількісних ознак [1]. Серед методів, які дозволяють вивчити генетичну цінність ліній сільськогосподарських культур в останні роки найбільш широке застосування знаходить метод діалельного аналізу [2].