

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

**ПРИСЯЖНЮК ЛАРИСА МИХАЙЛІВНА**

УДК 633.63:577.215

**ОСОБЛИВОСТІ ПРОЯВУ ТА СПОСОБИ ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНИХ  
КОНСТРУКЦІЙ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

06.01.05 – селекція і насінництво

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата  
сільськогосподарських наук**

**Київ – 2015**

## Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків Національної академії аграрних наук України

**Науковий керівник** – кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Петюх Григорій Павлович**,  
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків  
НААН України, завідувач лабораторії біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Васильківській Станіслав Петрович**,  
Білоцерківський національний аграрний університет  
МОН України, завідувач кафедри генетики, селекції  
та насінництва

кандидат біологічних наук, доцент  
**Кляченко Оксана Леонідівна**  
Національний університет біоресурсів і  
природокористування України,  
завідувач кафедри екобіотехнології та  
біорізноманіття

Захист відбудеться «03» листопада 2015 р. о 10-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.360.01 в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН за адресою: вул. Клінічна, 25, м. Київ-141, Україна, 03141.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН за адресою: м. Київ, вул. Клінічна, 25, корпус 2.

Автореферат розіслано «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат сільськогосподарських наук

Л. І. Сторожик

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Генетична інженерія рослин, на сьогодні, є невід'ємною частиною класичної селекції, до основних завдань якої належать: генетична трансформація рослин, експресія перенесених генів і її регуляція в клітинах трансгенних рослин. В Україні цукрові буряки (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.) є однією з важливих сільськогосподарських культур. Зважаючи на їх біологічні особливості, а саме перехресне запилення та дворічний цикл розвитку, деякі агрономічні проблеми, зокрема чутливість до гербіцидів, складно розв'язати методами традиційної селекції завдяки низькій частоті відповідних генів, що обумовлюють толерантності в популяціях буряків (Богомолова, 2002; Левенко, 2011). При створенні трансгенних рослин цукрових буряків та їх впровадженні в сільське господарство як комерційних культур найбільш важливим є досягнення високого і стабільного рівня експресії перенесених цільових генів як серед вихідних трансформантів та їх нащадків.

Проблема варіабельності експресії трансгенів має велике практичне значення в селекційній роботі при отриманні гібридних форм рослин (Маренкова, 2005; Чекалін та ін., 2009; Ullrich, 2015). Зокрема при отриманні генетично модифікованих рослин цукрових буряків шляхом перенесення інтродукованої конструкції в чоловічостерильні лінії при запиленні багатонасінним запилювачем, який містить трансгенну конструкцію (Furner et al., 1998; Головка, 2005; Гомаа, 2011). Тому, актуальним є з'ясування ефективності прояву та розробка методів оцінки трансгенів в селекційних матеріалах цукрових буряків.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження за темою дисертації виконувалися в рамках завдання 13.00.01.06Ф «Удосконалити методи дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків» (номер державної реєстрації РК 0111U003186) згідно плану наукових досліджень 13. «Цукрові буряки. Високопродуктивні гібриди цукрових буряків та ресурсощадні технології їх вирощування» Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є встановлення особливостей прояву та способів оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків, дослідження шляхів їх стабільного прояву в компонентах і гібридах та розроблення системи діагностики та оцінки експресії трансгенів в геномі цукрових буряків.

Для досягнення мети вирішували наступні завдання:

- провести ідентифікацію різних ділянок генетичної конструкції в геномі цукрових буряків толерантних до дії комерційного препарату Roundup;

- визначити зв'язок між наявністю складових елементів інтродукованої конструкції, а саме промоторних та термінаторних ділянок та гена інтересу (гена EPSPs);
- розробити спосіб аналізу активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату з використанням зворотної транскрипції;
- підібрати методику екстракції сумарної РНК із рослинного матеріалу цукрових буряків;
- визначити оптимальний метод проведення реакції зворотної транскрипції для оцінки активності генів цукрових буряків;
- встановити зв'язок між складом інтродукованої конструкції та ефективністю прояву гена інтересу в компонентах та гібридах;
- розробити спосіб діагностики генів в генетичних конструкціях з використанням мультиплексного підходу проведення ПЛР.

**Об'єкт дослідження** - особливості організації та прояву трансгенів у рослинах цукрових буряків.

**Предмет дослідження** – генетичні конструкції ЧС гібридів трансгенних цукрових буряків та їх компонентів-запилювачів.

**Методи дослідження:** лабораторні (культура *in vitro*, молекулярно-біологічні), статистичний (дисперсійний, кластерний аналіз).

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає в тому, що:

*вперше*

- розроблено метод оцінювання та відбору селекційного матеріалу рослин цукрових буряків з новими генетичними ознаками (толерантність до дії гліфосату) із застосуванням індивідуального підходу до оцінки вихідних компонентів та гібридів при створенні трансгенних рослин цукрових буряків шляхом запилення лінійного матеріалу запилювачем, який містить генетичну конструкцію з геном толерантності до дії гліфосату;
- встановлено взаємозв'язок між наявністю регуляторних елементів генетичної конструкції та гена інтересу, а також ефективністю його прояву в трансгенних рослинах цукрових буряків;
- розроблено мультиплексну систему ПЛР-аналізу на основі ідентифікації ключових елементів генетичної конструкції, що обумовлює толерантність до дії гліфосату для оцінки активності трансгену на основі виявлених взаємозалежностей між елементами трансгенної конструкції.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено метод оцінки активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в поєднанні із зворотною транскрипцією та мультиплексний підхід до ідентифікації структурних елементів інтродукованої генетичної конструкції. Використання даного методу у селекційній практиці дозволить значно прискорити та підвищити ефективність проведення добору серед різних генотипів цукрових буряків з метою створення гібридів з новими ознаками. Методичні рекомендації «**Індивідуальна оцінка та добір генотипів трансгенних рослин цукрових буряків**» розглянуті, схвалені та рекомендовані до видання Вченою Радою Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, протокол №10 від 25 травня 2015 р. та

впроваджені у навчальний процес Національного університету біоресурсів та природокористування України для лабораторно-практичних занять очної і заочної форми навчання зі спеціальностей «Біотехнологія» та «Селекція і генетика сільськогосподарських культур» на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною роботою здобувача, в якій висунуто робочу гіпотезу, розроблено і обґрунтовано програму досліджень. Дисертантом самостійно написано і оформлено дисертаційну роботу, опрацьовано відповідну літературу, виконано весь обсяг досліджень, здійснено узагальнення та статистичний аналіз експериментальних даних. Спільно з науковим керівником проведено вибір напрямку досліджень, сформульовано висновки та опубліковано наукові праці. Усі наукові положення, що винесено на захист, опрацьовано безпосередньо автором і за участі наукового керівника.

**Апробація результатів дисертаційного дослідження.** Основні результати дисертаційного дослідження доповідались на засіданнях методичної комісії та Вченої ради Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України (2011-2015 рр.) та апробовано на 6 міжнародних і всеукраїнських наукових конференціях: I та II Міжнародна конференція молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур» (Київ, Україна, 2012 р., 2013 р.), II та VI Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, Україна, 2013 р., 2015 р.), Міжнародна науково-практична конференція присвяченій 84-річчю з дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора Гончарова Миколи Дем'яновича (м. Суми, Україна, 2013 р.), X Всеукраїнська наукова конференція студентів, магістрів та аспірантів «Сучасні проблеми екології та геотехнологій» (м. Житомир, Україна, 2013 р.).

**Публікації.** Результати досліджень і матеріали за темою дисертації викладено у 14 наукових працях, з яких: 7 статей у наукових фахових виданнях, 6 тез доповідей, 1 методичні рекомендації.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках комп'ютерного тексту, складається із вступу, 5 розділів, висновків, рекомендацій для селекційної практики, списку використаних джерел та додатку. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 15 таблиць та 18 рисунків. Список використаних джерел налічує 285 найменування, у тому числі 99 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### **Стан та проблеми розвитку генетичної інженерії в селекції цукрових буряків**

Проаналізовано та узагальнено результати досліджень вітчизняних і зарубіжних вчених з впровадження біотехнологічних методів в селекції цукрових буряків та інших сільськогосподарських культур, які включають

використання різних методологічних підходів до створення рослин з новими властивостями, ідентифікації перенесених генів та оцінки їх ефективної роботи. Розглянуто найважливіші досягнення на межі селекційної та біотехнологічної галузей науки при створенні трансгенних форм сільськогосподарських рослин та використанні їх як комерційних культур.

На сучасному етапі розвитку генетичної інженерії рослин (Сорочинський та ін., 2005; Мишуткіна, 2007; Карпов та ін., 2010; Ivic-Naymes et al., 2005; Mano, 2010; Dugdale et al., 2014) розроблено і ефективно застосовуються безліч підходів та методик перенесення трансгенних генетичних конструкцій в сільськогосподарські рослини з метою покращення або надання їм нових властивостей, оскільки, деякі агрономічні проблеми, зокрема чутливість до гербіцидів, досить складно вирішити методами традиційної селекції.

На основі літературних даних, вивчено сучасні методи ідентифікації та оцінювання експресії перенесених генів, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), саузерн-блот аналіз, застосуванні ДНК-мікрочіпів, використання імуноферментного аналізу, методик гібридизації нуклеїнових кислот та зворотної транскрипції в поєднанні з ПЛР (ЗТ-ПЛР) тощо, які дозволяють на різному рівні чутливості визначати елементи перенесених генетичних конструкцій та активність трансгенів в рослинах. Проте, не зважаючи на наукові розробки вчених, залишається мало вивченим питання ефективної роботи таких генів в генетичному оточенні трансформованих рослин, а також в подальших поколіннях при схрещуванні селекційних форм. Зокрема, актуальним залишається питання ефективної експресії перенесених генів в селекційному матеріалі перехреснозапильних культур, таких як цукрові буряки.

Проаналізовано можливості стабілізації експресії трансгенів шляхом модифікацій методик генетичної трансформації та індивідуального контролю визначення активності трансгенів у вихідних формах з метою використання їх в подальших селекційних процесах. На основі цього, передбачено застосування індивідуального підходу до ідентифікації та визначення активності перенесених генів в селекційному матеріалі цукрових буряків толерантних до дії гліфосату методами ПЛР та ЗТ-ПЛР, а також можливості застосування цих методів у селекційній практиці.

На основі аналізу літературних джерел висунуто робочі гіпотези, визначено мету і завдання досліджень, розроблено програму та методику досліджень.

## **МАТЕРІАЛИ, УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Охарактеризовано рослинний матеріал, схеми і методики лабораторних досліджень та статистичної обробки даних. Лабораторні дисертаційні дослідження виконані в лабораторії біотехнології Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України (ІБКіЦБ), польові – на Ялтушківській дослідно-селекційній станції ІБКіЦБ впродовж 2012-2014 рр.

Ялтушківська дослідно-селекційна станція розташована в Лісостеповій зоні правобережної України, в північно-східній частині Вінницької області, на території Барського району. Ґрунти дослідної ділянки сірі опідзолені слабо-змиті, за механічним складом грубопилувато середньо-суглинкові. Зона діяльності станції характеризується помірно теплим вологим кліматом. Середня багаторічна температура січня становить  $-6^{\circ}\text{C}$ , а липня –  $+21^{\circ}\text{C}$ . Середньорічна сума опадів досягає 550 мм, у вегетаційний період випадає близько 350 мм. Середня глибина замерзання ґрунту 56 см, сума ефективних температур (вище  $+5^{\circ}\text{C}$ ) за період вегетації становить  $1942\text{--}2059^{\circ}\text{C}$ . Середня багаторічна вологість повітря складає 70%.

В цілому погодні умови в роки досліджень були сприятливими для росту та розвитку більшості сільськогосподарських культур, в тому числі й цукрових буряків. Однак, нестача опадів в другій половині вегетації та високі температури негативно вплинули на формування гібридного насіння та його якість.

В роботі використовували шість гібридів та багатонасінний запилювач цукрових буряків, який містить генетичну конструкцію з геном, що обумовлює толерантність до дії гліфосату (діюча речовина комерційного препарату *Roundup*). Показники одноростковості, стерильності, багатонасінності, вміст зольних елементів (калій, натрій) та інтенсивність розвитку хвороб визначали згідно загальноприйнятих методик (Роїк та ін., 2014), цукристість коренеплідів - за ДСТУ 4778-2007 «Буряки цукрові. Методи визначення якості коренеплідів». Урожайність цукрових буряків обліковували шляхом збирання і зважування основної продукції з усієї облікової ділянки. Стерильність та фертильність пилку визначали шляхом забарвлення розчином метиленового синього (Ярмолюк, Ширяєва, 1982).

Оцінку толерантності запилювача та гібридів до дії гербіциду проводили застосовуючи обробку тестових посівів розчином препарату *Roundup* та підраховуючи кількість толерантних рослин та виражали його у відсотках від загальної кількості рослин у досліді. Посівні якості гібридного насіння цукрових буряків (енергія проростання насіння, схожість та маса 1000 насінин), отриманого за наведеною схемою схрещування, визначали згідно ДСТУ 4138-2002 «Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості».

Стерилізацію насіння цукрових буряків позбавленого від коробочки проводили способом, підібраним на основі аналізу літературних даних (Головко, 2005; Кіщенко, 2006; Коломієць, 2008), який включав обробку насіння розчином гіпохлориду натрію із розведенням 1:3, що дозволяє позбавитись від додаткової інфекції на його поверхні та прискорить проростання.

Для отримання вегетуючих трансгенних рослин цукрових буряків на основі аналізу літературних джерел (Редько та ін., 1997; Головко, 2002; Коломієць, 2008) застосовували два варіанта частково модифікованого нами живильного середовища МС з різною концентрацією певних компонентів, а саме: кількістю мікроелементів МС, 6-БАП, сахарози та агару на 1 л середовища.

Для рослини цукрових буряків, у яких була виявлена активність гена, що обумовлює толерантність до гліфосату, проводили укорінення, адаптацію та висаджування в горщики за загальноприйнятими методиками (Коломієць, 2008; Войтовська, 2011). Для перевірки толерантності рослин цукрового буряку обробляли гербіцидом *Roundup* в концентрації 2 мкл/20 мл води на одну рослину.

Лабораторні молекулярно-біологічні методи дослідження включали методики екстракції нуклеїнових кислот, проведення ПЛР, електрофорезу в агарозному гелі та реакції зворотної транскрипції.

Виділення тотальної ДНК проводили за методикою на основі катіонного детергенту ЦТАБ (цетилтриметиламонію бромід) (Дрейпер та ін., 1991) та модифікованою нами для аналізу рослин цукрових буряків. Для ідентифікації складових елементів генетичної конструкції в рослинах цукрових буряків проводили ПЛР з праймерами специфічними до цільових послідовностей. В якості внутрішнього стандарту використовували ген ацетолактатсинтетази (*als*) цукрових буряків (Кіщенко, 2006; Пірко, 2009).

Продукти ПЛР візуалізували методом електрофорезу в агарозному гелі за загальноприйнятною методикою: в 1% - для фрагментів розміром до 1 kb та в 1,5% – для фрагментів більше 1 kb у 1<sup>x</sup> ТБЕ буфері протягом 30 хвилин при напрузі 100-120 В. Результати електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР визначали при ультрафіолетовому світлі та фіксували за допомогою системи документування гелів, що складається з транслюмінатора та відеосистеми з цифровою камерою (Остерман, 1981; Роїк та ін., 2007).

Виділення РНК з рослинних зразків цукрових буряків (частина листової пластини), що за результатами ПЛР аналізу містили досліджувану конструкцію або її частини проводили двома способами – за допомогою сорбенту та *Trizol*-реагенту. Екстракцію РНК здійснювали за допомогою набору реактивів «РИБО-Сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзор, Російська Федерація) згідно інструкції виробника. Виділення РНК з використанням *Trizol*-реагенту на основі гіанідинтіюціонату та фенолу проводили застосовуючи набір реагентів *Trizol RNA Prep (NEOGEN, Російська Федерація)* із різними температурами інкубації гомогенату: +60°C, кімнатна температура та +4°C.

Визначення концентрації нуклеїнових кислот проводили на спектрофотометрі за максимальною фотометричною адсорбцією ДНК та РНК при довжині хвилі 260 нм. За відношенням максимумів поглинання при 260 нм та 280 нм визначали чистоту препаратів нуклеїнових кислот (Епринцев и др., 2008).

В реакції зворотної транскрипції синтез першого ланцюга комплементарної ДНК (кДНК) на матриці РНК здійснювали з використанням наборів реагентів *GenPak<sup>®</sup> RT Core (NEOGEN, Російська Федерація)* та *GoScript<sup>™</sup> Revers Transcription System (Promega, USA)*, які відрізнялись за типом праймерів: випадкові гексануклеотидні праймери та праймери *Oligo(dT)*, які комплементарні до полі-А кінця мРНК згідно інструкцій виробників.

Для визначення активності генів в трансгенних рослинах цукрових буряків продукти реакції зворотної транскрипції (кДНК) використовували для



проведення ПЛР з аналогічним складом реакційної суміші та за однакових умов у випадку використання молекул ДНК як матриці.

Статистичну обробку даних, отриманих на основі електрофореграм продуктів ПЛР, проводили за допомогою кластерного аналізу з використанням незваженого методу середніх зв'язків та дисперсійного аналізу. Розрахунки та обробку даних здійснювали із застосуванням комп'ютерних програм *Microsoft Office Excel, Statistica 6.0* для *Windows*.

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЦІЛЮВИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНЕТИЧНОЇ КОНСТРУКЦІЇ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ДІЇ ГЛІФОСАТУ**

Проаналізовані показники стерильності та однонасінності ЧС ліній, урожайність, ураженість хворобами, основні показники посівних якостей насіння, якості коренеплодів досліджуваних гібридів та їх компонентів, толерантність до дії гліфосату, багатонасінність та фертильність запилювача, виявлено закономірності визначення регуляторних елементів генетичної конструкції та гена інтересу.

Згідно отриманих даних, урожайність ЧС лінії становила від 29,2 т/га до 38,2 т/га. У гібридів, отриманих на їх основі – 40,9-53,5 т/га. Цукристість знаходилась в межах 16,0-19,5%, для досліджуваних гібридів цей показник становив 17,3-19,8%. Оскільки лінії цукрових буряків відзначились низькою урожайністю, то відповідно низьким залишився збір цукру – 5,0-6,6 т/га. Співвідношення калію до натрію в коренеплодах ЧС ліній становило від 2,52:1 до 3,33:1, у гібридів цей показник знаходився в межах 3,41:1. За показниками стерильності та однонасінності ЧС лінії достовірно відрізняються на рівні значущості 5%, що свідчить про гетерогенність різних селекційних матеріалів та можливість в наступному покращення певних властивостей. Проте, слід зауважити, що лінії показали досить високі значення цукристості, що дає змогу застосовувати їх як цінний селекційний матеріал для створення гібридів. Відповідно до отриманих даних, в підсумку, за збором цукру найбільш продуктивними гібридами виявились 12-192 та 12-186 із середніми значеннями показнику за досліджувані роки – 10,0 т/га та 9,2 т/га.

При оцінці ураження гібридів основними хворобами листового апарата та коренеплодів проводили також аналіз вихідних селекційних матеріалів. Визначали інтенсивність розвитку еризифозу, церкоспорозу та вірусної жовтяниці, а також поширення кореневих гнилей у гібридів. Ступінь ураження еризифозом ЧС ліній в середньому за три роки спостережень варіював від 4% до 30% та 39% у запилювача 12-216. У гібридів відсоток ураження гібридів був нижчий і становив 6-14%. Також для досліджуваних ліній та запилювача характерним було досить високе ураження церкоспорозом – від 26% до 50%. Для гібридів цей показник становив 28-38%, що може свідчити про недостатню селекційну опрацьованість матеріалів. Тому для створення стійких до церкоспорозу гібридів необхідний додатковий пошук та залучення селекційних матеріалів, що є джерелами стійкості до хвороби. Проте всі лінії, запилювач та

гібриди на їх основі виявляли високу стійкість до вірусної жовтяниці – ступінь ураження не перевищувала 10%. Це свідчить про те, що в селекційний процес були залучені матеріали із стійкістю до цього захворювання. Також досліджувані гібриди виявляли високий ступінь стійкості до корневих гнилей (0,1-1,8%).

Запилювач 12-216 за показником багатонасінності не виявляв достовірної відмінності впродовж досліджуваних років, що свідчить про його однорідність за цією ознакою. Фертильність насіння запилювача 12-216 в залежності від років коливалась в межах 86,3-87,5% та мала статистично значущу різницю на рівні 5%, що може бути викликано погодними умовами при цвітінні (Недозім, 2012). Толерантність до дії гліфосату запилювача за груповою оцінкою склала 88,7-97,9%.

Одноростковість гібридів знаходилась в межах 88,0-97,0%. Енергія проростання насіння становила 59,0-75,5%, лабораторна схожість – 62,5-78,0%, маса 1000 насінин – 11,0-14,0 г.. Оскільки досліджувані гібриди є селекційними матеріалами, то показники якості насіння можуть бути викликані генетичними особливостями батьківських ліній (компонентів гібридизації). Отримані гібриди за показником толерантності до дії гербіциду мали статистично значущі відмінності при застосування їх групової оцінки, найвищий рівень толерантності було виявлено у гібриду 12-190 – 59,4%, що викликає потребу проведення індивідуального добору генотипів запилювача.

На основі обраної методики введення в культуру *in vitro* цукрових буряків одержали 286 рослин (76-86% життєздатних стерильних проростків від загальної кількості по 50 насінин кожного гібриду), які використовували для подальшого культивування. Отже, даний метод стерилізації забезпечує оптимальний рівень зволоження насіння для швидкого проростання на агаризованих живильних середовищах, та наявність асептичного матеріалу для використання в подальших дослідженнях.

Оцінку життєздатності пагонів на двох варіантах живильних середовищ проводили на 14 добу культивування. На середовищі №1 відбувалося значне пригнічення росту рослин, некрози нижньої частини пагона та листків, на 21 добу культивування спостерігали часткову загибель пагонів, життєздатними залишилось 36% рослин. При культивуванні гібридів на середовищі №2 також відбувалась загибель рослин, проте на 14 добу культивування життєздатними були 89% рослин, причому на 21 добу пригнічення в рості спостерігали лише у 4% рослин (рис. 1).



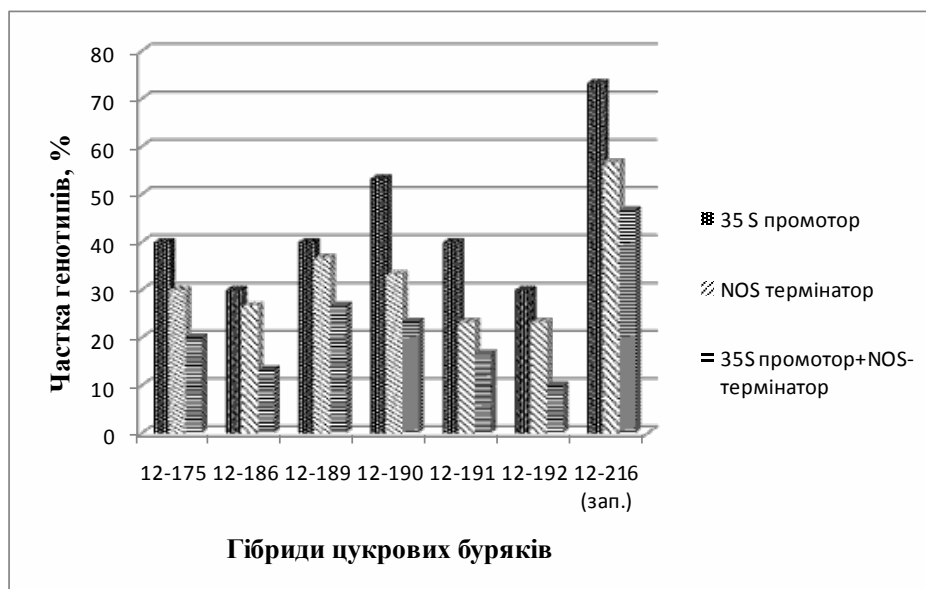
**Рис.1. Культивування рослин цукрових буряків впродовж 14 діб на середовищі №2**

В результаті, підібрано живильне середовище для отримання вегетуючих рослин трансгенних цукрових буряків в культурі *in vitro*, яке містило на 1 л середовища: макроелементи МС – 50 мл, 6-БАП – 0,1 мг, сахароза – 20 г, агар – 7 г. Таке співвідношення компонентів середовища дозволило отримати достатню кількість рослин (262 генотипів) для молекулярно-біологічних досліджень.

Концентрація отриманої ДНК із рослинних зразків гібридів знаходилась в межах 180-300 мкг/мл, показник чистоти – 1,73-1,90. Таким чином, кількість та якість виділеної ДНК свідчить про те, що обрана методика виділення ДНК з невеликої кількості рослинного матеріалу трансгенних цукрових буряків дозволяє отримати високоочищену ДНК достатньої чистоти з концентрацією не менше 180 мкг/мл, яку можна використовувати для проведення ПЛР з метою визначення складових частин генетичної конструкції.

Молекулярно-генетичний аналіз для ідентифікації регуляторних послідовностей, генів *EPSPs* та *als* досліджуваних генотипів гібридів та запилювача проводили за допомогою ПЛР із системою праймерів гомологічних до послідовностей цих генів.

В межах кожного гібриду було встановлено наявність послідовності 35S промотора від загальної кількості проаналізованих генотипів (по 30 генотипів) від 30% до 40%, у запилювача 12-216 – 73,3%; NOS-термінатора – 23,3-36,7%, у запилювача 12-216 – 56,7%. Частка генотипів, в яких ідентифіковано послідовності обох регуляторних елементів у досліджуваних гібридів складала від 10% до 26,7%, у запилювача 12-216 – 46,7% (рис. 2).



**Рис. 2. Розподіл наявності промоторної та термінаторної послідовностей у гібридів цукрових буряків**

Згідно отриманого розподілу, встановлено, що найбільшу кількість генотипів, в яких було ідентифіковано послідовності 35S промотору, NOS термінатору та обох регуляторних елементів одночасно відмічено для

запилювача 12-216 (46,7% від кількості досліджених генотипів запилювача), що є прогнозованим, оскільки він демонструє найбільший рівень толерантності за результатами групової оцінки шляхом оброблення гербіцидом. Щодо гібридів, отриманих за допомогою запилювача 12-216, то визначена наявність регуляторних елементів була значно нижчою в порівнянні із ним. Найменша кількість генотипів, в яких було ідентифіковано 35S промотор встановлено у гібридів 12-186 та 12-192 (по 30%), а NOS термінатор – у 12-191 та 12-192 (по 23,3%). Також слід відмітити, що мінімальна кількість генотипів, в яких визначено обидві регуляторні послідовності одночасно, відмічена у гібриду 12-192 (10% від кількості проаналізованих рослин цього гібриду). Для генотипів гібридів 12-189 та 12-190 характерна відносна стабільність генетичної конструкції, оскільки в них ідентифіковано 35S промотор та NOS термінатор у найбільшій кількості генотипів (26,7% та 23,3% відповідно). Це може бути зумовлено тим, що частина досліджуваних генотипів має не повну генетичну конструкцію з відсутньою промоторною або термінаторною послідовністю. Також внаслідок дії механізмів репарації ДНК або інших процесів можливі заміни в нуклеотидних послідовностях регуляторних елементів, у зв'язку з чим їх складно ідентифікувати.

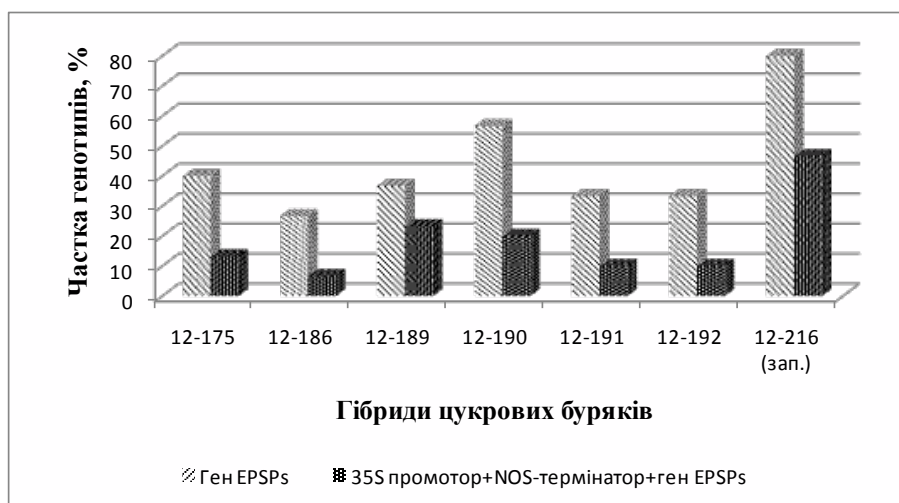
Отже, можливі перебудови структури перенесеної генетичної конструкції, а також перебудови рослинної ДНК в локусі інтеграції трансгенної конструкції з утворенням дуплікованих фрагментів є потенціальними джерелами зміни експресії (інактивації) вбудованих генів. Зокрема, це також може бути причиною варіабельності експресії гена інтересу при створенні трансформованих рослин цукрових буряків шляхом запилення ЧС-ліній запилювачем, який містить інтродуковану конструкцію.

В результаті реакції ампліфікації з праймерами гомологічними до послідовності гена неоміцинофосфотрансферази-II (*npt II*) в досліджуваних зразках продуктів очікуваного розміру виявлено не було. Виходячи з цього, генетична конструкція для трансформації вихідного матеріалу цукрових буряків толерантних до дії гліфосату не містила селективного маркера або при створенні конструкції використовувались інші гени, що визначають його фенотиповий прояв (наприклад, ген бета-D-глюкоронідази, ген толерантності до гігроміцину тощо) (Сорочинський, 2005).

При ідентифікації гена толерантності до дії гліфосату (гена *EPSPs*) було встановлено наявність гена інтересу в генотипах гібридів (у розрахунку від загальної кількості проаналізованих рослин) – 26,7-56,7%, у запилювача 12-216 – 80% (рис. 3).

За даними розподілу встановлено, що найбільше генотипів, в яких було ідентифіковано ген інтересу відмічено для запилювача 12-216 (80% від кількості проаналізованих генотипів), як і у випадку ідентифікації регуляторних елементів. Для запилювача також характерна найбільша стабільність генетичної конструкції, оскільки за отриманим розподілом у 46,7% досліджуваних генотипах ідентифіковані як регуляторні елементи так і ген *EPSPs*. У гібриду 12-186 виявлено найменшу кількість генотипів, які містили

ген інтересу та досліджувані елементи трансгенної конструкції (6,7% від загальної кількості проаналізованих генотипів в межах цього гібриду).

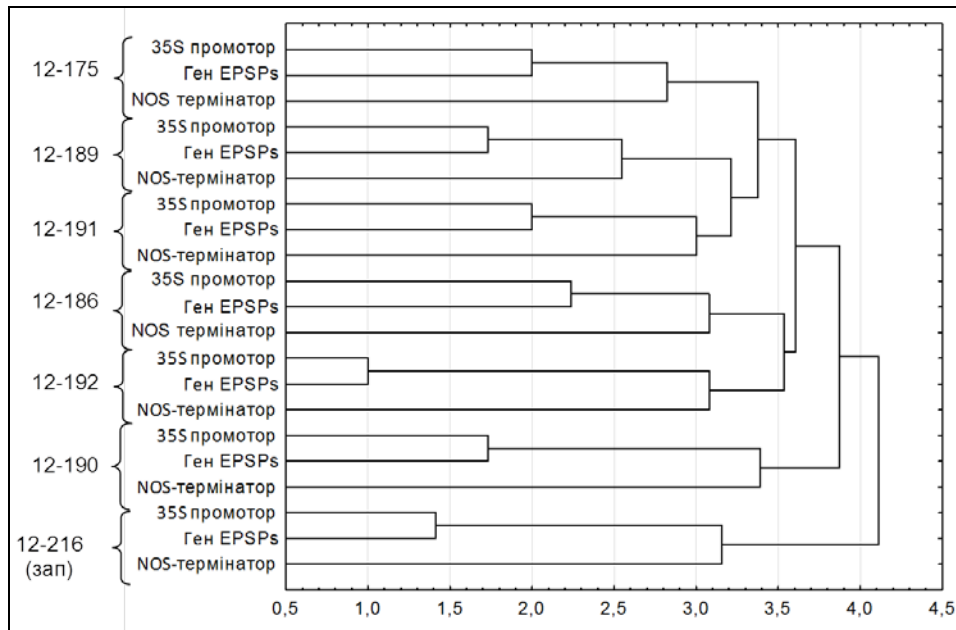


**Рис. 3. Розподіл наявності гена *EPSPs* та регуляторних послідовностей у гібридів цукрових буряків**

Генотипи гібридів 12-189 та 12-190, як і при ідентифікації регуляторних елементів, демонструють найбільшу стабільність генетичної конструкції серед гібридів, що були отримані за допомогою запилювача 12-216 (23,3% та 20% відповідно), не зважаючи на те, що ген *EPSPs*, був виявлений у більшій кількості генотипів гібриду 12-175 (40% від загальної кількості генотипів гібриду).

Причому, слід зауважити, що ген інтересу був ідентифікований лише у тих генотипів, в яких була встановлена наявність промоторної, термінаторної або обох регуляторних послідовностей одночасно. Згідно отриманих даних, досліджувані елементи досліджуваної генетичної конструкції (35S промотор, NOS-термінатор та ген *EPSPs*) були виявлені в генотипах запилювача 12-216 від загальної кількості у 46,7% та у гібридів від 6,7% до 23,3%. В тих генотипах, в яких не було ідентифіковано хоча б однієї з регуляторних послідовностей, був відсутній також і ген *EPSPs*.

Для представлення встановленої залежності проводили кластерний аналіз за допомогою незваженого методу середніх зв'язків. Результати ієрархічної класифікації в вигляді філогенетичного дерева наведено на рис. 4. В один кластер за наявністю чи відсутністю певної ділянки генетичної конструкції були об'єднані 35S промотор та ген *EPSPs*, що свідчить про те, що у всіх досліджуваних гібридах при наявності промоторної послідовності, в більшості випадків був ідентифікований ген інтересу. Визначення гену *EPSPs* також залежало від наявності NOS-термінатора, проте в меншій мірі, ніж промотору, що підтверджується результатами кластеризації, оскільки термінатор був розподілений у прилеглі до «промотор-ген інтересу» кластери.



**Рис. 4. Розподіл гібридів цукрових буряків за наявністю/відсутністю складових генетичної конструкції**

Таким чином, за результатами кластерного аналізу встановлено зв'язок між наявністю регуляторних елементів інтродукованої конструкції та геном інтересу; визначено, що при ідентифікації складових частин генетичної конструкції з метою добору селекційного матеріалу толерантного до гліфосату, зокрема, при оцінці запилювача, доцільно першочергово визначати регуляторні послідовності, а потім - ген інтересу.

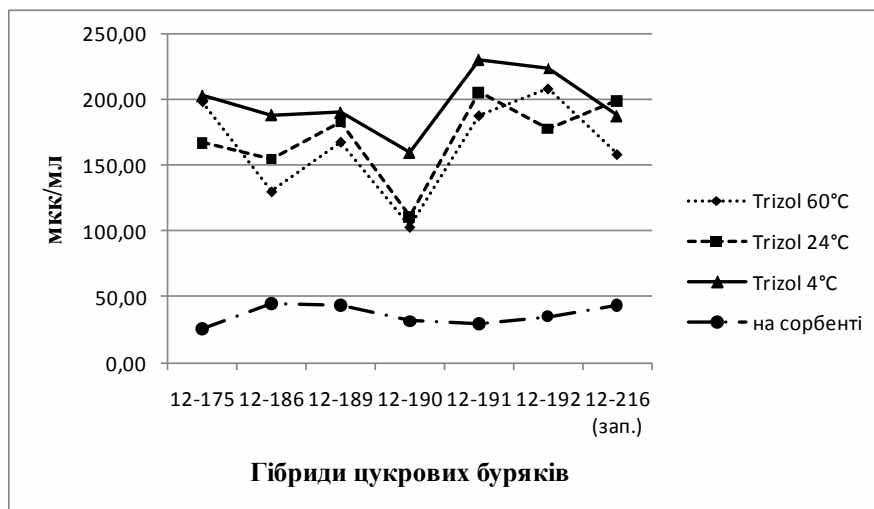
### **ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

Наведено експериментальні дані щодо визначення оптимальної методики екстракції сумарної РНК із рослинного матеріалу цукрових буряків. Охарактеризовано особливості проведення реакції зворотної транскрипції для визначення активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату. Встановлено залежність між наявністю послідовностей регуляторних елементів, гена інтересу та його активністю в трансгенних рослинах цукрових буряків.

Отримана сумарна РНК за допомогою сорбенту та *Trizol*-реагенту з різними температурами інкубації на етапі лізису клітинних мембран з генотипів цукрових буряків, в яких ідентифіковані послідовності гена *EPSPs* та обох або одного з регуляторних елементів (92 генотипи, з них запилювач – 24), була оцінена за показниками чистоти та концентрації.

Найбільшу кількість сумарної РНК отримано з використанням *Trizol* реагенту (120-203 мкг/мл), значення чистоти знаходилося в межах 1,34-1,38. Концентрація РНК, отриманої з використанням сорбенту становила 25-45 мкг/мл. Варто врахувати, що чистота РНК при виділенні на сорбенті істотно вища (1,8-2,0), ніж при екстракції *Trizol*, але низька її концентрація (рис. 5)

показує, що даний метод є менш прийнятним для виділення РНК з рослинного матеріалу, оскільки за літературними даними (Епринцев и др., 2008) концентрація сумарної РНК для проведення реакції зворотної транскрипції має становити 100-200 мкг/мл.



**Рис. 4. Концентрація сумарної РНК в залежності від способу екстракції та температури інкубації**

Встановлено, що температура інкубації при екстракції РНК з рослин цукрових буряків, застосовуючи гуанідинтіюціонат і фенол, впливає на вихід і чистоту нуклеїнової кислоти. Так, концентрація сумарної РНК, отриманої з інкубацією при температурі 60°C і 24°C не має суттєвих відмінностей і становить 100-200 мкг/мл. Високі значення концентрації відмічено для варіанту з температурою 4°C - 160-230 мкг/мл. Однак при порівнянні чистоти встановлено, що у варіанті з температурою інкубації 60°C значення знаходиться в межах 1,5-1,8, тоді як у двох інших випадках воно коливається від 1,0 до 1,5, що свідчить про високий вміст у даних препаратах РНК речовин, які здатні пригнічувати реакцію зворотної транскрипції і впливати на вихід кДНК.

Згідно отриманим даним, найнижча чистота сумарної РНК була виявлена при екстракції за допомогою *Trizol* реагенту за температури інкубації 4°C (0,86), найвища – за екстракції на силікатному сорбенті (1,96). Виділення сумарної РНК з використанням *Trizol* реагенту дозволило отримати препарати з чистотою, яка є прийнятною для проведення реакції зворотної транскрипції.

За результатами досліджень, встановлено, що оптимальне співвідношення концентрація/чистота виявлено при екстракції *Trizol* з температурою інкубації +60°C. Використання гуанідинтіюціонату і фенолу у складі *Trizol*-реагенту для екстракції РНК є ефективним через його здатність швидко проникати в клітини і пригнічувати активність клітинних нуклеаз та забезпечувати видалення ДНК з суміші, оскільки на першому етапі виділяються обидві нуклеїнові кислоти.

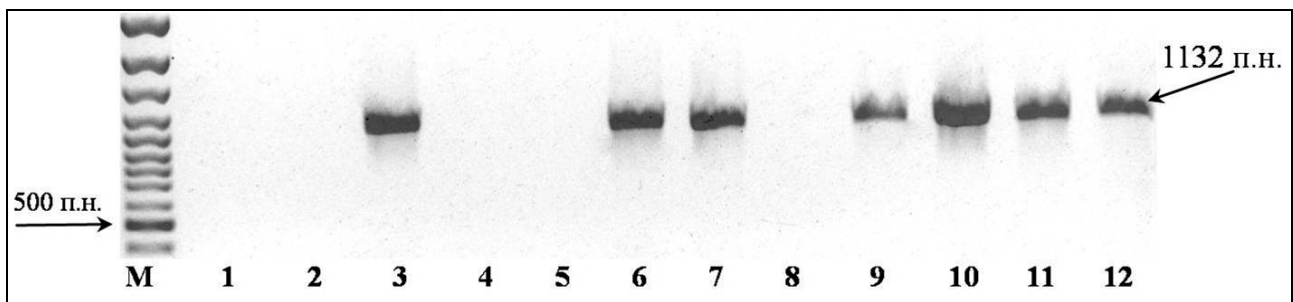
Отже, екстракція РНК з рослинних тканин цукрових буряків із застосуванням суміші гуанідинтіюціонату і фенолу при температурі +60°C на етапі лізису, дозволяє отримувати сумарну РНК з невеликої кількості тканини,

що робить його придатним для дослідження експресії генів, які пов'язані з обмеженою кількістю біологічного матеріалу.

Для підбору ефективної системи зворотної транскрипції, а також з метою переконатися у відсутності домішок ДНК, які в подальшому можуть виступати в якості матриці при проведенні ПЛР та призводити до хибно позитивних результатів або утворенню неспецифічних продуктів проводили реакцію ампліфікації кДНК з використанням відповідних праймерів, специфічних до гена ацетолактатсинтази цукрових буряків. В результаті ампліфікації кДНК отриманої за допомогою набору реагентів для зворотної транскрипції з випадковими гексануклеотидними праймерами після проведення електрофорезу не було виявлено ампліконів очікуваного розміру.

За використання системи для зворотної транскрипції з праймерами *Oligo(dT)<sub>15</sub>* в результаті ПЛР були отримані амплікони розміром 840 п. н., які відповідають послідовності гена ацетолактатсинтази. Таким чином, за використання системи зворотної транскрипції із *Oligo(dT)*-праймерами у всіх досліджуваних генотипах було виявлено активність гена внутрішнього контролю, що дозволяє в подальшому визначити експресію гена інтересу, виключаючи можливість отримання хибно негативних результатів, в результаті помилок проведення реакції зворотної транскрипції або процесу виділення РНК.

Молекулярно-біологічний аналіз досліджуваних генотипів для визначення активності гена інтересу проводили за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів до отриманих кДНК. Після проведення реакції ампліфікації були отримані фрагменти ДНК, що відповідають досліджуваній послідовності гена *EPSPs*. Візуалізацію отриманих продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі (рис. 6).



**Рис. 6. Визначення активності гена *EPSPs*.** М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder*); 1 – РНК гібриду 189/1; 2 – негативний контроль (кДНК не трансформованого гібриду); 3-4 – кДНК гібриду 12-189; 5-6 – кДНК гібриду 12-190; 7-8 – кДНК гібриду 12-192; 9-11 – кДНК гібриду (запилювач) 12-216; 12 – ДНК гібриду 189/1

Наявність ампліконів розміру 1132 п. н., які співпадають з фрагментами отриманими за допомогою реакції ампліфікації ДНК досліджуваних зразків, на треках, на яких представлені генотипи досліджуваних гібридів 12-189/1, 12-190/7, 12-192/1 та запилювача 12-216/2, 12-216-3, 12-216/6 свідчить про експресію гена толерантності до дії гліфосату в цих зразках.



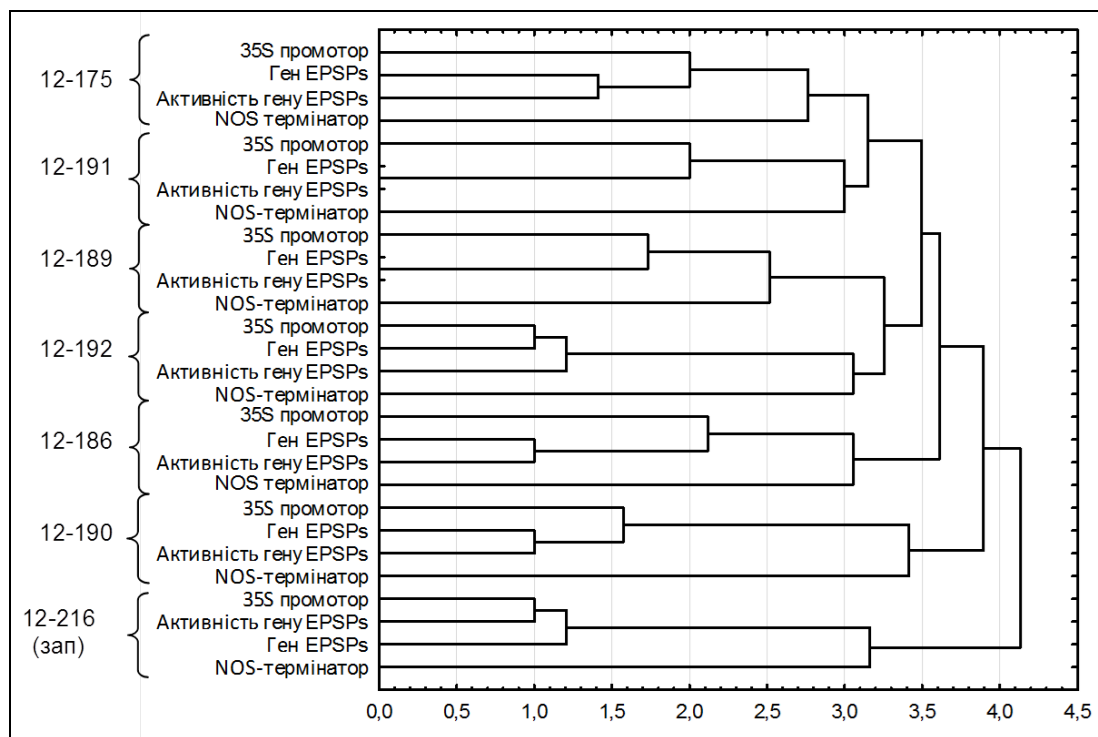
Виявлена активність гена *EPSPs* у досліджуваних гібридів цукрових буряків, яка представлена як частка генотипів від загальної кількості проаналізованих в межах кожного гібриду від 23,3% до 53,3%, запилювача 12-216 – 76,7%. Згідно отриманим даним, експресія спостерігалась у рослин, в яких наявні *35S* промотор та ген *EPSPs*, а також *NOS*-термінатор та ген *EPSPs*, причому активність гена інтересу спостерігалась частіше за присутності промотора, ніж термінатора (рис.7).



**Рис. 7. Розподіл наявності регуляторних послідовностей, гену інтересу та його активності у гібридів цукрових буряків**

Результати отримані при ідентифікації складових елементів досліджуваної конструкції, а саме наявність *35S* промотору, *NOS*-термінатору та гена *EPSPs* вказують, що у гібридів 12-189 та 12-190 було виявлено найбільшу кількість генотипів, що містили ці елементи (23,3% та 20% відповідно). Для цих гібридів також характерна і найбільша кількість генотипів, в яких була визначена активність гена інтересу (від кількості генотипів в межах одного гібриду 36,7% та 53,3% відповідно). Зокрема, можна припустити, що в отриманні цих гібридів приймали участь генотипи запилювача, що містили всі елементи трансгенної конструкції та стабільну експресію трансгена. У запилювача 12-216 відмічено найбільшу кількість генотипів, в яких виявлено наявність та активність гена *EPSPs* (80% та 76,7%), а також стабільність генетичної конструкції (46,7%), що обумовлює толерантність цих рослин до дії гліфосату. Найменша кількість генотипів, в яких встановлено активність гена інтересу була у гібриду 12-186 (23,3% від кількості генотипів в межах гібриду), як і наявність даного гену та досліджуваних елементів трансгенної конструкції.

Для виявлення кореляції рівня активності гена толерантності до дії гліфосату від виявлення послідовностей ДНК регуляторних елементів та гена інтересу інтродукованої конструкції в досліджуваних генотипах цукрових буряків застосовували кластерний аналіз за допомогою незваженого методу середніх зв'язків (рис. 8).



**Рис. 8. Розподіл гібридів цукрових буряків за наявністю/відсутністю складових генетичної конструкції та активністю гену *EPSPs***

В результаті аналізу, були отримані сім кластерів, які сформувались за наявністю/відсутністю гена *EPSPs* та його активністю. Це вказує на те, що в гібридах при наявності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату була виявлена його активність, та якщо в генотипах не було ідентифіковано ген інтересу, не залежно від визначення регуляторних послідовностей, то була відсутня і його експресія. До цих кластерів прилягає 35S промотор, а також NOS-термінатор, який знаходиться на більш віддаленій відстані від блоку «ген-активність-промотор». Це свідчить, що активність гена інтересу залежить не тільки від наявності його послідовності ДНК, але й від визначених регуляторних послідовностей, зокрема, 35S промотору. Отже, існує тісна залежність між наявністю промотору, послідовності ДНК гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату та його активністю.

При виявленні гена інтересу та термінаторної послідовності NOS в більшості випадків не спостерігалась його експресія, на відміну від взаємодії промотору та гена *EPSPs*. Це свідчить про те, що можливі зміни у структурі термінаторної послідовності, завдяки яким її складно ідентифікувати, чинять незначний вплив на експресію інтродукованого гена.

За результатами кластерного аналізу встановлено, що активність гена толерантності до дії гліфосату знаходиться в більш тісній залежності від наявності послідовності 35S промотору та гена *EPSPs* в ніж від NOS-термінатору.

Беручи до уваги можливі причини інактивації трансгенів (утворення кластерів тандемно організованих трансгенів з перебудовами у вигляді прямих і інвертованих повторів, утворення мікрodelецій по кінцевим і внутрішнім

районам, перебудови рослинної ДНК в районі інтеграції, порушення цілісності району розташування генів в районі інтеграції тощо) не тільки у нащадків, а й у вихідних для гібридизації трансформованих форм рослин, з метою стабільної передачі конструкції необхідно проводити індивідуальну оцінку наявності складових елементів трансгенної конструкції та експресії гена інтересу в запилювачі, що дозволить знизити ймовірність порушення активності трансгенів в отриманих гібридах.

Для перевірки толерантності до дії гліфосату рослини досліджуваних гібридів та запилювача цукрових буряків, в яких виявлена активність гена *EPSPs* за допомогою ЗТ-ПЛР аналізу пересаджували на живильне середовище для вкорінення з подальшим перенесенням в горщики. В результаті обробки розчином гербіциду *Roundup* на 10-й день трансгенні рослини цукрових буряків (85 рослин, в тому числі 23 рослини запилювача 12-216) виявились толерантними до дії гербіциду. Таким чином, експериментальні дані, отримані методом ЗТ-ПЛР з виявлення експресії гена *EPSPs*, узгоджуються з результатами обробки рослин препаратом *Roundup* в горщиках.

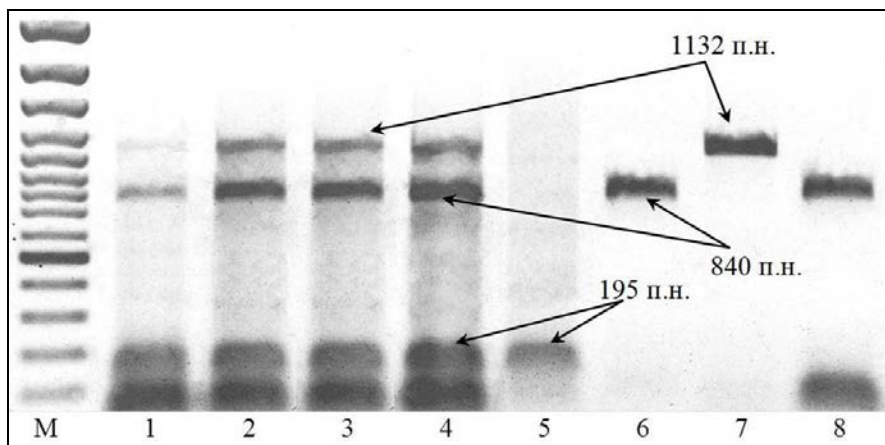
## **СТВОРЕННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ДІЇ ГЛІФОСАТУ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

Розроблено мультиплексний підхід до ідентифікації складових елементів генетичної конструкції в геномі цукрових буряків толерантних до дії гліфосату. Встановлено, що експресія гена інтересу залежить від складу інтродукованої генетичної конструкції, зокрема, встановлена залежність активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату від наявності послідовностей ДНК *35S* промотору та гена *EPSPs* в геномі досліджуваних генотипів. Тому при розробці системи мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в якості цільових послідовностей застосовували *35S* промотор та ген *EPSPs* одночасно, а також ген ацетолатат синтази цукрових буряків як внутрішній контроль.

На першому етапі були проведені моноплексні реакції для кожної дослідженої послідовності з метою підбору програми ампліфікації і співвідношення концентрації праймерів в кожній реакції, на другому – серії мультиплексних ПЛР для вивчення закономірностей одночасної ампліфікації досліджуваних фрагментів. Аналіз даних, отриманих в моно- і мультиплексних реакціях, дозволив визначити оптимальні параметри роботи розробленої мультиплексної тест-системи. Препарати ДНК тестували після серії послідовних розведень: 50 нг, 100 нг, 150 нг, 200 нг (рис. 9).

За використання в мультиплексних реакціях різної кількості матриці ДНК на електрофореграмі відмічено різну інтенсивність сигналів ДНК ампліконів на треках, які відповідають цим зразкам, що вказує на різну кількість отриманих продуктів ампліфікації. В процесі ПЛР, реакційна суміш якої містила 50 нг ДНК, відбувалось напрацювання невеликої кількості продуктів реакції, про що свідчить менш інтенсивний сигнал на треку, що відповідає даному зразку. При застосуванні 100 нг та 150 нг було отримано достатню кількість продуктів

ампліфікації, що дозволяє встановити наявність цільових послідовностей в цих зразках після проведення електрофорезу. На треку, який відповідає зразку, в якому було використано 200 нг досліджуваної ДНК відмічено наявність невеликої кількості неспецифічних продуктів ампліфікації розмірами від 200 до 800 п. н. та значне переваження нуклеїновими кислотами.



**Рис. 9.** Електрофореграма мультиплексної ПЛР з визначення генів *EPSPs*, *als* та *35S* промотору. М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*); 1-4 – ДНК гібриду 12-189/1 (розведення 50 нг; 100 нг; 150 нг; 200 нг відповідно); 5-7 – ДНК гібриду 12-189/1 (моноплекси); 8 - негативний контроль (ДНК нетрансформованого гібриду)

Як відомо (Ребриков и др., 2009), гени внутрішнього контролю мають високу копійність в порівнянні з послідовностями трансгенної конструкції. Зважаючи на це, в нашій роботі були використані найнижчі концентрації праймерів для ідентифікації гена ацетолактатсинтази в порівнянні з іншими двома парами, що дало можливість уникнути конкурування за компоненти реакційної суміші. Проте слід зауважити, що не зважаючи на цей прийом на всіх треках спостерігається більша інтенсивність сигналів ДНК ампліконів, які були отримані при застосуванні праймерів гомологічних до послідовності гену внутрішнього контролю, що в свою чергу не вплинуло на вихід інших продуктів мультиплексної реакції.

Таким чином, нами була розроблена мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція з системою праймерів гомологічних до послідовностей *35S* промотору, гена *EPSPs* та гена внутрішнього контролю цукрових буряків (*als*), яка дозволяє одночасно проводити оцінку селекційного матеріалу та отриманих гібридів за основними послідовностями генетичної конструкції, що забезпечують стабільну експресію інтродукованого гена. 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 із стабільним рівнем експресії трансгена.

## ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведено теоретичне узагальнення та обґрунтовано новий підхід до вирішення наукового завдання – експресії трансгенів в рослинах цукрових буряків шляхом індивідуальної діагностики генотипів селекційного матеріалу з використанням культури *in vitro* методом полімеразної ланцюгової реакції в поєднанні із зворотною транскрипцією. Встановлено особливості проведення реакції зворотної транскрипції з урахуванням специфічності та розміру цільових послідовностей та виявлено закономірності між особливостями ідентифікації інтродукованого гену та ефективністю його прояву в компонентах та гібридах.

2. Вперше розроблений та експериментально підтверджений мультиплексний метод ПЛР для ідентифікації складових елементів генетичної конструкції в рослинах цукрових буряків, толерантних до дії гліфосату. Встановлено, що індивідуальну оцінку селекційного матеріалу цукрових буряків доцільно проводити за послідовностями 35S промотору та гена EPSPs, застосовуючи в якості внутрішнього контролю ген als цукрових буряків.

3. Запропоновано схему аналізу селекційного матеріалу трансгенних рослин цукрових буряків при визначенні активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату з метою добору гібридів та інших селекційних форм з ефективною експресією перенесеного гена.

4. Підібрано живильне середовище для отримання рослин цукрових буряків в культурі *in vitro* з урахуванням впливу концентрацій макросолей, співвідношення регуляторів росту, сахарози та агару на ріст і розвиток рослин. Створено колекцію із 262 генотипів асептичних рослин з метою використання їх в молекулярно-біологічних дослідженнях.

5. Проведено серію ПЛР із специфічними праймерами гомологічними до послідовностей регуляторних елементів та гену інтересу для виявлення 35S промотору, NOS-термінатору та гена EPSPs в рослинах цукрових буряків толерантних до дії гліфосату. Досліджувані елементи генетичної конструкції були ідентифіковані в генотипах запилювача 12-216 від загальної кількості у 46,7% та у гібридів: 12-175 – 13,3%, 12-186 – 6,7%, 12-189 – 23,3%, 12-190 – 20%, 12-191 – 10%, 12-192 – 10%. У тих генотипах, в яких не було ідентифіковано хоча б однієї з регуляторних послідовностей, був відсутній також і ген EPSPs.

6. Встановлено тісну залежність між наявністю гена інтересу та промоторною послідовністю в геномі цукрових буряків. Показано, що при ідентифікації складових частин інтродукованої генетичної конструкції з метою добору селекційного матеріалу толерантного до гліфосату, зокрема, при оцінці запилювача, доцільно першочергово визначати регуляторні послідовності, а потім визначати ген інтересу.

7. Підібрано оптимальну методику виділення сумарної РНК з рослин цукрових буряків на основі гуанідинтіоціонату та фенолу з температурою інкубації +60°C, яка дозволяє отримувати препарати РНК задовільної кількості та якості для використання в якості матриці для синтезу кДНК.

8. Проведено ампліфікацію отриманих в результаті реакції зворотної транскрипції кДНК та обґрунтовано доцільність застосування Oligo(dT)-праймерів для проведення реакції зворотної транскрипції з метою визначення активності гену EPSPs застосовуючи в якості внутрішнього контролю ген ацетолактат синтази цукрових буряків.

9. Встановлено активність гена EPSPs у досліджуваних гібридів від загальної кількості: 12-176 – 36,7%, 12-186 – 23,3%, 12-189 – 33,3%, 12-190 – 53,3%, 12-191 – 33,3%, 12-192 – 26,7%; запилювача 12-216 – 76,7%. За результатами кластерного аналізу показано, що активність гену EPSPs, знаходиться в більш тісній залежності від наявності 35S промотору та послідовності гена, ніж від наявності NOS термінатору.

10. Експериментально підтверджено, що ген толерантності до гліфосату не ідентифікується та не експресується без визначеної хоча б однієї з регуляторних послідовностей. Визначено, що експресія гена інтересу EPSPs спостерігалась у рослин, в яких було ідентифіковано 35S промотор та ген EPSPs, а також NOS термінатор та ген EPSPs, причому активність гена інтересу спостерігалась частіше за присутності промотора, ніж термінатора. Генотипів, в яких би ідентифікували тільки ген EPSPs виявлено не було.

## РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ

У селекційні практики для ідентифікації складових елементів генетичної конструкції в рослинах цукрових буряків рекомендовано використовувати методичні рекомендації «Індивідуальна оцінка та добір генотипів трансгенних рослин цукрових буряків» розроблені за участю автора на основі ЗТ-ПЛР та мультиплексного підходу.

Оцінювання ознаки толерантності до дії гліфосату з метою створення толерантних гібридів цукрових буряків здійснювати за показниками експресії гена EPSPs. Індивідуальний добір серед перспективних генотипів багатонасінних запилювачів та інших селекційних форм слід проводити згідно ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізу за наявністю всіх складових елементів генетичної конструкції, а також активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових виданнях

1. **Кожемякіна Л. М.** Ідентифікація генів промоторних ділянок генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків / **Л. М. Кожемякіна**, Г. П. Петюх // Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків - Вип. 14. – 2012 р. – С. 450-452.

2. **Кожемякіна Л. М.** Ідентифікація структурних частин генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків / **Л. М. Кожемякіна** // Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків - Вип. 17 (том II). – 2013 р. – С. 316-319.

3. **Кожемякіна Л. М.** Визначення промоторних та термінаторних ділянок генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків / Л. М. Кожемякіна // Збірник наукових праць Львівського національного аграрного університету. – м. Дубляни, 2013 р. – С 306-310.

4. **Кожемякіна Л. М.** Оптимизация условий выделения РНК из трансгенных растений сахарной свеклы для оценки экспрессии интродуцированных генов / Л. М. Кожемякіна // Агроекологічний журнал. - 2014 р. - №1. – С. 106-110.

5. **Кожемякіна Л. М.** Виділення РНК та реакція зворотної транскрипції при визначенні ефективності прояву трансгенів в рослинах цукрових буряків / Л. М. Кожемякіна // Науковий вісник НУБіП України. – Вип. 195. – Ч.1. – 2014. – С. 121-125.

6. **Prysiazhnyuk L. M.** Selection and optimizing of nucleic acids' extraction methods from transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants / L. M. Prysiazhnyuk // Біоресурси і природокористування. – 2014. – Т.6. – №5-6. – С. 14-18.

7. **Присяжнюк Л. М.** Визначення експресії генів в трансгенних рослинах цукрових буряків // Л. М. Присяжнюк / Цукрові буряки. - №5. – С. 16-18.

### Тези і матеріали конференцій

8. **Кожемякіна Л. М.** Визначення структурних частин генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків за допомогою ПЛР в реальному часі / Л. М. Кожемякіна, Г. П. Петюх // Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених [«Біотехнологія: звершення та надії»], (м. Київ, 16-17 травня 2013 р.) / Кабінет міністрів України, Національний університет біоресурсів і природокористування України. – К.: НУБіП України, 2013 р. – С. 29-30.

9. **Кожемякіна Л. М.** Ідентифікація генів генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків стійких до гліфосату / Л. М. Кожемякіна // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 84-річчю з дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора Гончарова Миколи Дем'яновича, (м. Суми, 28 травня 2013 р.) / Міністерство аграрної політики і продовольства України, Сумський національний аграрний університет. – Суми: Сумський націон. аграр. ун-т, 2013 р. – С. 51-53.

10. **Кожемякіна Л. М.** Введення в культуру *in vitro* трансгенних цукрових буряків / Л. М. Кожемякіна, Г. П. Петюх // Матеріали X Всеукраїнської наукової конференції студентів, магістрів та аспірантів [«Сучасні проблеми екології та геотехнологій»] (м. Житомир, 10-12 квітня 2013 р.) / Міністерство освіти і науки України, Житомирський технологічний університет. – Житомир: ЖДТУ, 2013 р. – С. 53.

11. **Присяжнюк Л. М.** Виявлення активності гену толерантності до гліфосату в рослинах цукрових буряків / Л. М. Присяжнюк // Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та

молодих вчених [«Біотехнологія: звершення та надії»], (м. Київ, 21-22 травня 2015 р.) / Кабінет міністрів України, Національний університет біоресурсів і природокористування України. – К.: НУБіП України, 2015 р. – С. 39-41.

### Методичні рекомендації

12. Індивідуальна оцінка та добір генотипів трансгенних рослин цукрових буряків (методичні рекомендації) / Г. П. Петюх, Л. М. Присяжнюк, М. В. Роїк. – К.: ФОП Корзун Д.Ю., 2015. – 23 с.

### АНОТАЦІЇ

**Присяжнюк Л. М. Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво. – Інститут біоенергетичних культур та цукрових буряків НААН України. – Київ, 2015.

У дисертаційній роботі викладено результати досліджень із розроблення методу оцінки активності генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в поєднанні із зворотною транскрипцією, а також мультиплексний метод ПЛР для ідентифікації послідовностей 35S промотору, генів *EPSPs* та *als* в рослинах цукрових буряків, толерантних до дії гліфосату.

Обґрунтовано доцільність застосування екстракції сумарної РНК на основі гуанідинтіюанату та фенолу з температурою інкубації на етапі лізису +60°C, а також *Oligo(dT)*-праймерів для проведення реакції зворотної транскрипції з метою визначення активності гена *EPSPs*. Встановлено тісну залежність наявності гена інтересу від визначення промоторної послідовності в геномі цукрових буряків та залежність активності гена інтересу від наявності послідовності 35S промотору та гена *EPSPs*. Показано, що при ідентифікації складових частин інтродукованої генетичної конструкції та визначення активності гена, що обумовлює толерантність до дії гліфосату з метою добору селекційного матеріалу, зокрема, при оцінці запилювача, доцільно першочергово визначати регуляторні послідовності та ген інтересу з наступним визначенням його активності.

**Ключові слова:** трансгенні цукрові буряки, ПЛР, сумарна РНК, зворотна транскрипція, ген *EPSPs*.

**Присяжнюк Л. М. Особенности проявления и способы оценки генетических конструкции в трансгенных растениях сахарной свеклы.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство. – Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины. – Киев, 2015.



В диссертационной работе изложены результаты исследований по разработке метода оценки активности генов с помощью полимеразной цепной реакции в сочетании с обратной транскрипцией, а также мультиплексный метод ПЦР для идентификации последовательностей 35S промотора, генов *EPSPs* и *als* в растениях сахарной свеклы, толерантных к действию глифосата.

Сформулирована схема анализа селекционного материала для определения активности гена интереса при получении трансгенных гибридов и подборе толерантных форм сахарной свеклы на основе разработанного подхода к оценке активности гена, который обуславливает толерантность к действию коммерческого препарата *Roundup*. Создана коллекция из 262 генотипов растений в культуре *in vitro* с целью использования их в молекулярно-биологических исследованиях на питательной среде с учетом концентраций макросолей, соотношение регуляторов роста, сахарозы и агара.

На основе анализа последовательностей ДНК исследуемой трансгенной конструкции установлено тесную зависимость определения гена интереса от наличия промоторной последовательности в геноме сахарной свеклы. В тех генотипах, в которых не было идентифицировано хотя бы одной из регуляторных последовательностей, отсутствовал также и ген *EPSPs*.

Обосновано применение экстракции суммарной РНК из растительного материала сахарной свеклы на основе гуанидинтиоционата и фенола с температурой инкубации на этапе лизиса +60°C. Установлена эффективность применения *Oligo(dT)*-праймеров для проведения реакции обратной транскрипции на основе амплификации кДНК последовательности гена внутреннего контроля (*als*) с целью определения активности гена *EPSPs*.

По результатам кластерного анализа определено, что активность гена *EPSPs*, находится в более тесной зависимости от наличия последовательностей его ДНК и 35S промотора, чем от определения *NOS* терминатора. Установлено, что наличие и экспрессия гена, который обуславливает толерантность к глифосату, не определяются без регуляторных элементов.

Показано, что при идентификации составных частей интродуцированной генетической конструкции и определения активности гена, который обуславливает толерантность к действию глифосата, с целью отбора селекционного материала, в частности, при оценке опылителей, целесообразно в первую очередь определять регуляторные последовательности и ген интереса с последующим определением его активности.

**Ключевые слова:** трансгенная сахарная свекла, ПЦР, суммарная РНК, обратная транскрипция, ген *EPSPs*.

**Prysyazhnyuk L. M. Peculiarities of expression and evaluation methods of genetic constructs in transgenic plants of sugar beet.** – Manuscript copyright. Thesis for a degree in agricultural sciences, specialty 06.01.05 – breeding and seed production. – Institute of bioenergy crops and sugar beet NAAS of Ukraine. – Kyiv, 2015.

The thesis presents the results of research in development of the method for assessing the activity of genes by polymerase chain reaction in combination with

reverse transcription and multiplex PCR for identification the sequences of 35S promoter, genes EPSPs and als in tolerant to glyphosate action sugar beet plants. Demonstrated feasibility of usage of total RNA extraction from phenol on the basis of guanidine cyanate with incubation temperature on the lysis stage + 60°C and Oligo (dT) primers for reverse transcription reaction to determine the activity of EPSPs gene. It was discovered close correlation between the presence of the gene of interest sequence and localization of promoter sequence in genome of sugar beet and correlation between activity of the gene of interest and presence of 35S promoter sequence and EPSPs gene. It was shown that the identification of genetic components of the introduced genetic construction and gene activity determination that causes tolerance to glyphosate action towards to breeding material selection, particularly in the context of pollinators assessing, it is appropriate to define regulatory sequences in gene of interest with subsequent determination of its activity.

**Key words:** transgenic sugar beets, PCR, total RNA, reverse transcription, EPSPs gene.