БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

Гнатюк І.С.
аспірантка; молодший науковий співробітник,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України;
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

Шатоха Д.Г.
студентка; лаборант,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»;
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

Дзуг М.С.
студентка; молодший науковий співробітник,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України;
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

Варченко О.І.
інженер І категорії; керівник групи біотехнології рослин,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України;
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

Парій М.Ф.
кандидат біологічних наук; директор,
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

Симоненко Ю.В.
кандидат біологічних наук; старший науковий співробітник,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України;
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН РІПАКУ ОЗИМОГО *B. NAPUS* L., СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ ГЛІФОСАТУ

На сьогоднішній день гліфосат залишається діючою речовиною більшості несистемних гербіцидів, таких як Раундап®, Торнадо®, Ураган-Форте (Syngenta), «Тріумф», «Агрокіллер» та ін., що застосовуються для боротьби з однорічними та багаторічними бур'янами в період вегетації. Дія гліфосату обумовлена тим, що він інгібує фермент рослин 5-енолпірувіл-шикимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS). Хоча в Україні вже були створені трансгенні рослини ярого ріпаку з генами стійкості до гліфосату [1; 2; 3], на сьогоднішній день залишається актуальним питання генетичної трансформації саме озимого ріпаку. Метою нашого дослідження було підтвердити трансгенну природу рослин озимого ріпаку лінії української селекції, стійких до дії гербіциду гліфосату.

Загальну ДНК виділяли CTAB методом [4] із листкового матеріалу рослин-регенерантів T_0 ріпаку озимого *B. napus* L., отриманих після трансформації лінії *Bn1* генетичною конструкцією pSPG2254 за допомогою *A. tumefaciens* GV3101 в культурі *in vitro*. Конструкція pSPG2254 несе мутантний ген *epsps B. napus* під контролем подвійного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти та 35S термінатора цього вірусу (CaMV). Крім того, вектор містить селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), репортерні гени β-глюкуронідази (*gus*) та зеленого флуоресцентного білка (*gfp*).

Реакційна суміш для постановки ПЛР на визначення гена *gfp* включала: специфічні праймери, по 2 мкл буфера для ПЛР 10xDreamTaq™ GreenBuffer («Thermo Fisher Scientific»), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфата («Thermo Fisher Scientific»), 2 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase («Thermo Fisher Scientific»), 100 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Форвардний праймер до гена *gfp*: 5'-GTG-AGC-AAG-GGC-GAG-GA-3'; реверсний праймер до гена *gfp*: 5'-TTA-CTT-GTA-CAG-CTC-GTC-CAT-3'. Довжина очікуваного фрагмента – 717 пн. Реакції проводили з

використанням наступних профілів: початкова денатурація 5 хв при 95°C, 35 циклів – денатурація 30 с при 95°C, відпал праймерів 30 с при 52°C, елонгація 1 хв при 72°C, кінцева елонгація 5 хв при 72°C.

Загальну РНК виділяли за допомогою GeneJET™ RNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific») із листкового матеріалу біотехнологічних рослин озимого ріпаку *B. napus* L. першого покоління (T_1). Синтез кДНК здійснювався з використанням набору RevertAid RT Kit («Thermo Fisher Scientific») згідно інструкцій виробника. У випадку зворотної транскрипції використовували: 4 мкл 5×Reaction buffer, 1 мкл Random Hexamer primer (0,2 мкг/мкл), 2 мкл 10 мМ dNTP Mix, 0,1 нг – 5 мкг РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки), 0,5 мкл RiboLock RNase inhibitor, 40 од/мкл, 1 мкл RevertAid Reverse transcriptase, 200 од/мкл. Реакційну суміш доводили до кінцевого об’єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Проводили визначення експресії трансгенів шляхом ПЛР, використовуючи 2 мкл продуктів реакції ЗТ у 20 мкл реакційної суміші та специфічні праймери до гена *bar*. Форвардний праймер до гена *bar*: 5'-AAT-CTC-GGT-GAC-GGG-CAG-GA-3'; реверсний праймер до гена *bar*: 5'-TAC-ACC-CAC-CTG-CTG-AAG-T-3'. Довжина очікуваного фрагмента – 231 пн. Реакції проводили з використанням наступних профілів: початкова денатурація 5 хв при 95°C, 35 циклів – денатурація 30 с при 95°C, відпал праймерів 30 с при 58°C, елонгація 1 хв при 72°C, кінцева елонгація 5 хв при 72°C.

Продукти ампліфікації розділяли в 1% агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію. Довжину фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, «Thermo Fisher Scientific»).

Інтеграцію трансгена *gfp* було підтверджено на рівні ДНК у 9 з 12 незалежних ліній T_0 озимого ріпаку, отриманих після генетичної трансформації за допомогою вектора pSPG2254 (рис. 1).

На рівні РНК експресію трансгена *bar* було підтверджено в усіх досліджуваних рослинах ріпаку озимого T_1, отриманих після самозапилення T_0 та обробки гербіцидом Раундап® (діюча речовина – гліфосат, 450 г/л) із розрахунку 200 л/га. Результати ПЛР із продуктами реакції ЗТ за геном *bar* зображені на рисунку 2.

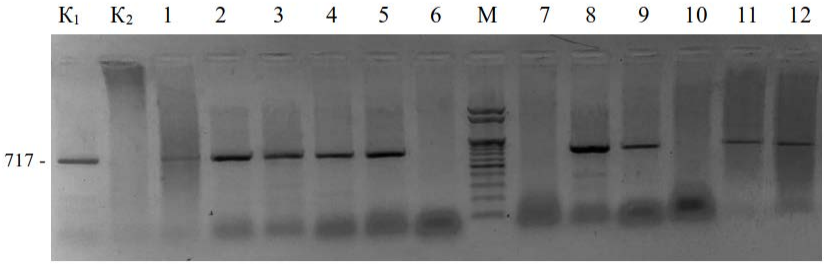

Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації послідовності гена *gfp*:

Доріжки 1–12 – досліджувані зразки; $К_1$ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pSPG2254; $К_2$ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку озимого лінії *Bn1*; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

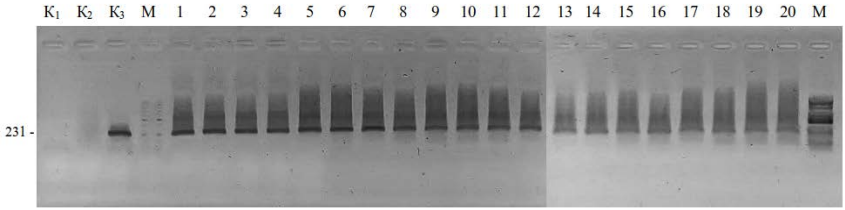

Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*:

Доріжки 1–20 – досліджувані зразки; $К_1$ – негативний контроль – Milli-Q; $К_2$ – негативний контроль – ДНК інтактної рослини ріпаку озимого лінії *Bn1*; $К_3$ – позитивний контроль – ДНК *A. tumefaciens* GV3101 pSPG2254; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

Таким чином, нами було підтверджено трансгенну природу 9 з 12 рослин T_0 озимого ріпаку на рівні ДНК за геном *gfp*, та показано експресію гена *bar* в усіх досліджуваних рослин T_1 покоління, стійких до дії гербіциду гліфосату, на рівні РНК.

Список використаних джерел:

1. Sakhno, L. O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering. *Biopolymers and Cell*, 2013, vol. 29, no. 6, pp. 443–453. doi: 10.7124/bc.000838

2. Sakhno, L. O., Lystvan, K. V., Кuchuк, M. V. Antioxidant activity of leaf of biotechnological rape (*Brassica napus* L.), resistant to herbicides based on glyphosate and glufosinate, *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu, Seriia : Biolohiia*. 2015, Vol. 3. No 36. Pp. 62–70.

3. Sakhno, L.O., Komarnitsskii, I.K., Kuchuk, M. V. Inheritance of glyphosate and glufosinate resistance in T_1-T_2 generations of biotechnological canola (*Brassica napus* L.) plants, *Visnyk Ukrainskoho tovarystva henetykiv i selektsioneriv*. 2015. Vol. 13. No. 1. Pp. 3–10.

4. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory.

Кирієнко А.В.
аспірантка;

Симоненко Ю.В.
кандидат біологічних наук,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України

Парій М.Ф.
кандидат біологічних наук,
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕТЕРОЛОГІЧНИХ ГЕНІВ *BAR* ТА *CAS9* В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ТА СПЕЛЬТИ

Генетичне редагування генів рослин підходом CRISPR-Cas9 дає можливість одержати біотехнологічні рослини із покращеними господарсько-цінними ознаками. Зокрема, для злакових роду *Triticum* ssp. важливу роль відіграє висота рослин та стійкість до гербіцидів імідазолінового ряду.