

УДК 633.63/577.213.3

## Розробка мультиплексної системи ПЛР для ідентифікації цукрових буряків, толерантних до дії гліфосату

Л. М. Присяжнюк\*, Ю. В. Шитікова, О. О. Волчков

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

**Мета.** Створити мультиплексну систему для ідентифікації толерантних до гліфосату буряків за допомогою ПЛР. **Методи.** Молекулярно-генетичні методи аналізу нуклеїнових кислот. **Результати.** Наведено результати досліджень з визначення параметрів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для розроблення мультиплексної системи для ідентифікації структурних елементів трансгенної конструкції з геном *cp 4 epsps*, що забезпечує толерантність до гліфосату. Для отримання ампліконів цільових послідовностей ДНК визначено такі значення температурних режимів ПЛР: крок 1 (початкова денатурація) 95 °С – 3 хв; крок 2 (напрацювання специфічних продуктів реакції): денатурація 95 °С – 45 с; гібридизація праймерів 55 °С – 50 с; елонгація 72 °С – 1 хв; кількість циклів – 40; крок 3 (кінцева елонгація) 72 °С – 6 хв. Проведено серію ПЛР з метою добору оптимальної кількості матриці ДНК для ефективно оцінки трансгенних рослин цукрових буряків за наявністю специфічних послідовностей. **Висновки.** Для ідентифікації трансгенних цукрових буряків, толерантних до дії гліфосату, доцільно визначати в окремих генотипах 35S промотор та ген *cp 4 epsps*. Встановлено, що в процесі добору температурних параметрів мультиплексної реакції на ідентифікацію гена *als* не впливало збільшення температури гібридизації праймерів на 5 °С, що дало змогу включити специфічні праймери для визначення цієї послідовності як внутрішнього контролю. За результатами пробних мультиплексних реакцій визначено концентрації дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфатів) та іонів  $Mg^{2+}$ , які дали змогу виключити можливість отримання неспецифічних фрагментів та хибно

негативних результатів. Визначено оптимальну кількість матриці ДНК (100–150 нг) для ефективно оцінки трансгенних рослин цукрових буряків за наявністю специфічних послідовностей. Отримані результати дали змогу розробити мультиплексну тест-систему для ідентифікації трансгенних цукрових буряків, толерантних до дії гліфосату, за допомогою якої можна одночасно визначити 35S промотор, ген *cp 4 epsps* та ген *als* як внутрішній контроль реакції.

**Ключові слова:** ген *cp 4 epsps*, 35S промотор, трансгенні цукрові буряки, параметри ампліфікації.

## Вступ

Однією з основних світових проблем у XXI ст. є глобальна енергетична криза. У зв'язку з цим важливого значення набувають біологічні та біофізичні дослідження, спрямовані на поліпшення властивостей сільськогосподарських культур, стабільність виробництва і зниження його втрат [1]. Такі проблеми сьогодні успішно розв'язують шляхом використання трансгенних рослин. В Україні цукрові буряки (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.) є однією з важливих сільськогосподарських культур [2, 3].

На цей час опубліковано ряд робіт з генетичної трансформації *B. vulgaris* за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, біолістичного методу, методом трансформації протопластів із застосуванням поліетиленгліколю для отримання стійких до гербіцидів ліній та гібридів [4]. Сучасний селекційний процес цукрових буряків ґрунтується на використанні методів гібридної селекції, тому актуальним є розроблення ефективного методу ідентифікації трансформантів, який дасть змогу значно прискорити та підвищити ефективність проведення добору серед різних генотипів цукрових буряків з метою створення гібридів з новими ознакам, зокрема з толерантністю до дії гліфосату [5–7].

**Мета досліджень** – створити мультиплексну систему ідентифікації толерантних до гліфосату буряків за допомогою ПЛР.

## **Матеріали та методика досліджень**

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 здійснювали згідно з модифікованою авторами методикою на основі методу, розробленого Дрейпером та ін. [8], з використанням катіонного детергента ЦТАБ із частини листової пластини.

Показники якості нуклеїнових кислот (концентрацію та чистоту) оцінювали на основі відношення поглинання за довжини хвиль 260 нм і 280 нм (260/280 нм) за допомогою спектрофотометра BioPhotometr (Eppendorf, Німеччина) [9, 10].

За сучасними даними, близько 80% трансформованих рослин, що виявляють толерантність до дії гербіцидів, у складі перенесеної генетичної конструкції містять конститутивний промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (35S промотор) та термінаторний сигнал гена нопалін синтази (NOS-термінатор) [11].

Для виявлення частин генетичної конструкції у трансгенних рослин цукрових буряків використовували метод ПЛР з подальшим електрофоретичним розділенням продуктів реакції [12, 13]. Для добору параметрів ПЛР, визначення оптимальних концентрацій компонентів реакційної суміші спочатку проводили серії моноплексних реакцій, а потім на основі отриманих даних здійснювали дослідження з розроблення мультиплексної системи.

Підбираючи оптимальні умови проведення ПЛР, визначали такі параметри реакції: склад реакційної суміші – концентрація праймерів, Taq-полімерази,  $Mg^{2+}$ ; програма ампліфікації – температура гібридизації

праймерів, тривалість кожного кроку циклу ампліфікації, кількість циклів, тривалість попередньої денатурації. Далі, використовуючи дані, отримані у процесі проведення моноплексних реакцій [14], був підібраний склад реакційної суміші для мультиплексної ПЛР системи, що забезпечує стабільне напрацювання ампліконів [15–20].

Для ідентифікації гена *cp 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. Як внутрішній стандарт використовували ген ацетолактатсинтетази (*als*) цукрових буряків (табл. 1) [6].

Таблиця 1

**Характеристика праймерів для ідентифікації досліджуваних послідовностей**

Цільові послідовності	Праймери	Нуклеотидна послідовність 5' ..... 3'	Кількість нуклеотидів, п. н.	CG-склад, %	Температура плавлення, °C	Очікуваний розмір ампліконів, п. н.
35S промотор	35S-1	<i>gcTccTAcAAATgccATcA</i>	19	47	54,5	195
	35S-2	<i>gATAgTgggATTgTgcgTcA</i>	20	50	57,3	
<i>cp 4 epsps</i>	<i>pr1</i>	<i>cAccggTCTTTTggAAggTgAAg</i>	23	52	60,5	1132
	<i>pr2</i>	<i>AAcgAgAcccATAAcgAggAAgc</i>	23	52	59,4	
<i>als</i>	<i>bvpr1</i>	<i>ggTcAggTTcAgccAcAAAcTc</i>	22	55	57,2	840
	<i>bvpr2</i>	<i>gAAgAcTcgTTAgcccAAccAAg</i>	23	52	57,9	

ПЛР проводили на ампліфікаторі *TC-Y CreaCon (USA)*. Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 0,01% Тритон X-100), 1,5–2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), по 0,2–1 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю *Taq*-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл.

Для кожної пари праймерів застосовували такі температурно-часові параметри ПЛР: крок 1 (початкова денатурація) 95 °C – 2–5 хв; крок 2 (напрацювання специфічних продуктів реакції): денатурація 94–95 °C – 30–

60 с; гібридизація праймерів 50–55 °С – 40–60 с; елонгація 72 °С – 30–60 с; кількість циклів – 35–40; крок 3 (кінцева елонгація) 72 °С – 5 хв.

Продукти реакції ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 1–1,5% агарозному гелі у 1<sup>x</sup> ТБЕ (трис-боратний буферний розчин) за загальноприйнятою методикою з бромистим етидієм [12, 13]. Електрофорез проводили протягом 30 хв за напруженості електричного поля 5 В/см.

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. Розмір отриманих фрагментів визначали за допомогою комп'ютерної програми *Totallab 2.0*.

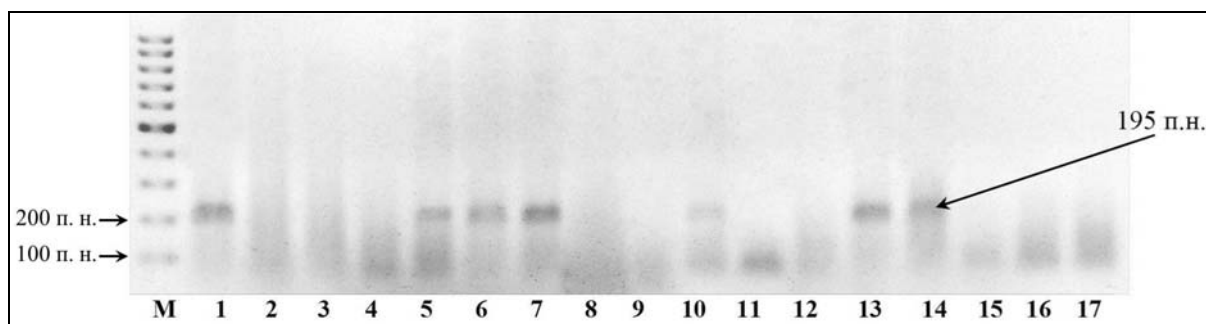
### **Результати досліджень**

Встановлено [14], що ідентифікацію трансгенних цукрових буряків толерантних до дії гліфосату, доцільно проводити за 35S промотором, геном *cp 4 epsps* та геном *als* (внутрішній контроль). Концентрація отриманої ДНК становила 180,4–280,4 мкг/мл, показники чистоти препарату ДНК були в межах 1,75–1,93. Для ідентифікації структурних елементів генетичної конструкції та цільових генів з метою добору генотипів, які містять всі елементи конструкції, проводили ПЛР зі специфічними праймерами окремо для кожної з досліджуваних послідовностей ДНК. У подальшому цей матеріал використовували для розроблення 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 (рис. 1).

Відсутність ампліконів на треку № 17 негативного контрольного зразка свідчить про достовірність отриманих даних та відсутність контамінації. Наявність ампліконів розміром 195 п.н. на треках № 1, 5–7, 10, 13–14, які відповідають зразкам досліджуваної ДНК генотипів 12-189/1, 12-190/6, 12-190/7, 12-192/1, 12-192/6, 12-216/2, 12-216/3, свідчить про наявність у цих

рослинах 35S промотору. Відсутність амплікону зазначеного розміру на треках № 2–4, 8–9, 11–12, 15–16 з продуктами ампліфікації ДНК гібридів 12-189/3, 12-189/5, 12-190/5, 12-192/2, 12-192/3, 12-192/7 та запилювача 12-216/6, 12-216/8, 12-216/9 вказує на те, що ці генотипи не містять промоторної ділянки або вона не ідентифікована.

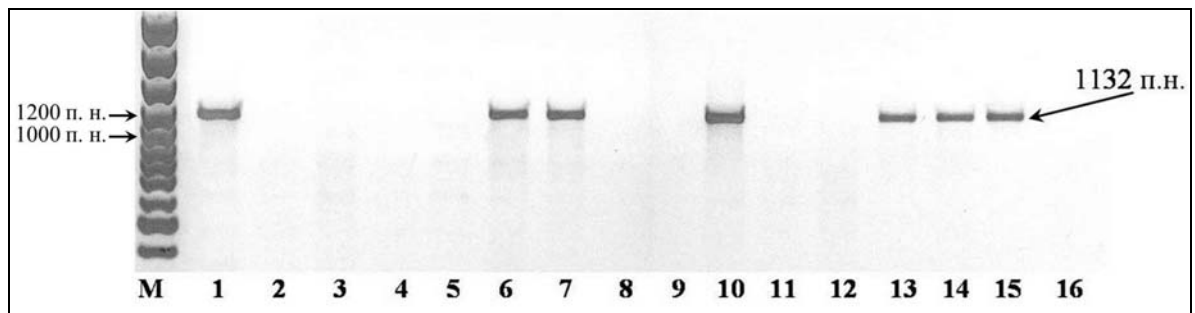


**Рис. 1. Ідентифікація 35S промотора:**

М – маркер молекулярної маси (GeneRuler™ 100bp); 1–3 – ДНК гібрида 12-189;  
4–6 – ДНК гібрида 12-190; 7–11 – ДНК гібрида 12-192; 12–16 – ДНК гібрида 12-216;  
17 – негативний контроль (ДНК нетрансформованого гібрида)

ПЛР-аналіз досліджуваних рослин цукрових буряків з метою ідентифікації гена, що зумовлює толерантність до дії гліфосату, виявив наявність ампліконів розміру 1132 п.н., які відповідають пошуковій послідовності гена *cp 4 epsps* (рис. 2).

Як видно з рис. 2, ген *cp 4 epsps* було ідентифіковано в зразках 12-189/1, 12-190/7, 12-192/1, 12-192/6, 12-216/2, 12-216/3, 12-216/6 на треках № 1, 6–7, 10, 13–15. Трек № 16, який відповідає зразку негативного контролю, не містить ампліконів, що свідчить про відсутність контамінації та ефективність проведення ПЛР. Відсутність продуктів ампліфікації очікуваного розміру на треках № 2–5, 8–9, 11–12, які відповідають зразкам 12-189/3, 12-189/5, 12-190/5, 12-190/6, 12-192/2, 12-192/3, 12-192/7, 12-216/8, вказує на те, що в цих генотипах наявність гена інтересу не встановлено.



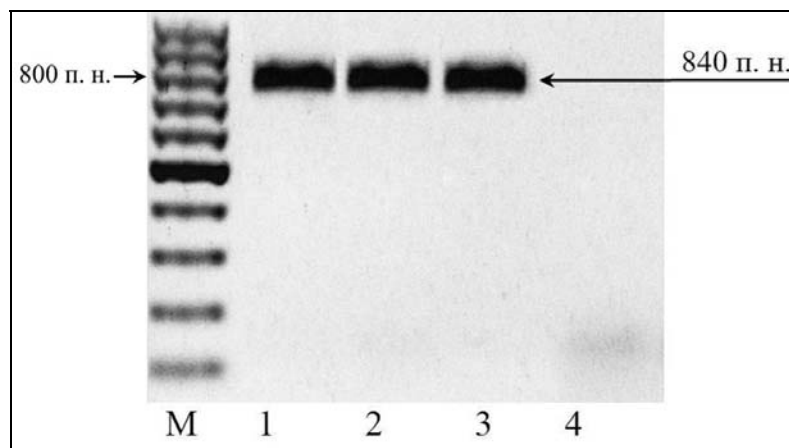
**Рис. 2. Ідентифікація гена *cp 4 epsps*:**

М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*); 1–3 – ДНК гібрида 12-189; 4–6 – ДНК гібрида 12-190; 7–11 – ДНК гібрида 12-192; 12–15 – ДНК гібрида 12-216; 16 – негативний контроль (ДНК нетрансформованого гібрида)

Значення температур гібридизації різнилися для різних праймерів: 50 °С для виявлення гена внутрішнього контролю (ген *als*) [14] та 55 °С – для праймерів, які дають змогу ідентифікувати послідовності 35S промотору та гена інтересу (гена *cp 4 epsps*), тому для ідентифікації гена ацетолактат синтази цукрових буряків ПЛР проводили, використовуючи термоцикли з температурою гібридизації 55 °С. В результаті електрофорезу в агарозному гелі були виявлені амплікони розміром 840 п. н., що відповідають послідовності гена внутрішнього контролю та збігаються з фрагментами, які були отримані за допомогою ампліфікації з даними праймерами за температури гібридизації 50 °С (рис. 3).

За результатами досліджень, отримано амплікони очікуваного розміру на треках, що відповідають зразкам, ампліфікацію ДНК яких проводили за температури гібридизації 55 °С. У проведених моноплексних реакціях для ідентифікації гена *als* підвищення температури на 5 °С не вплинуло на можливість визначення гена внутрішнього контролю цукрових буряків, оскільки розміри ампліконів збігались за однакових інших параметрів реакції та концентрації компонентів. У разі застосування як матриці для ампліфікації ДНК нетрансформованого гібрида з температурою гібридизації праймерів 55 °С були отримані амплікони розміром 840 п. н., що свідчить про високу консервативність цієї послідовності та можливість використання її в

мультиплексній реакції. Відсутність продуктів реакції на треку негативного контролю (№ 4) свідчить про достовірність отриманих даних, відсутність контамінації при виділенні ДНК та чіткого дотримання процедури приготування реакційної суміші та проведення реакції ампліфікації.



**Рис. 3. Ідентифікація гена *als*:**

М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder*); 1 – ДНК гібрида 12-189/1 (температура гібридизації 50 °С); 2 – ДНК гібрида 12-189/1 (температура гібридизації 55 °С); 3 – ДНК нетрансформованого гібрида (температура гібридизації 55 °С); 4 – негативний контроль виділення ДНК

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

Діапазон робочих концентрацій  $Mg^{2+}$  становить 0,5–5,0 мМ, оскільки підвищена концентрація, наприклад, 10 мМ, інгібує полімеразу на 40–50% [12]. Зі збільшенням концентрації  $Mg^{2+}$  підвищується температура денатурації ДНК, збільшується кількість продуктів ампліфікації, проте істотно знижується специфічність реакції, що призводить до утворення безлічі неспецифічних продуктів ампліфікації. Таким чином, оптимальну концентрацію іонів  $Mg^{2+}$  добирали експериментально, враховуючи



особливості послідовностей матриці та праймерів, діапазон концентрацій становив 1,5–2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Діапазон концентрації дНТФ для проведення ПЛР становить від 50 до 500 мкМ. У дослідженнях під час розроблення мультиплексної системи для ідентифікації трансгенних цукрових буряків концентрація дНТФ становила 200 мкМ. Такої кількості достатньо для ампліфікації одночасно трьох фрагментів ДНК з високою точністю синтезу. Зі збільшенням кількості дНТФ у дослідженнях спостерігалась наявність неспецифічних фрагментів ампліфікації. Тому в процесі проведення мультиплексної реакції для ідентифікації цільових послідовностей з метою визначення трансгенних рослин цукрових буряків підвищувати концентрацію дНТФ є недоцільним.

Оскільки для ідентифікації цільових послідовностей у процесі проведення моноплексних реакцій концентрації праймерів, дНТФ та іонів Mg<sup>2+</sup> були різними, то для проведення мультиплексної реакції в процесі роботи були підібрані оптимальні концентрації компонентів для виявлення трансгенних цукрових буряків, толерантних до гліфосату (табл. 2). Об'єм реакційної суміші становив 20 мкл.

Таблиця 2

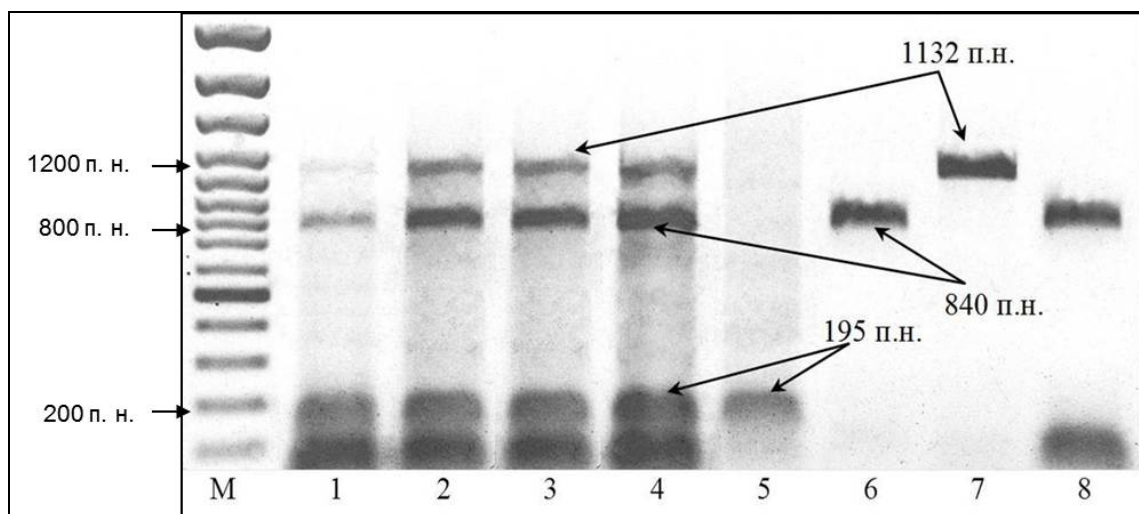
### Склад реакційної суміші ПЛР мультиплексної ампліфікаційної системи

Цільові послідовності	Праймери		Концентрація компонентів реакційної суміші			
	позначення	концентрація, мкМ	дНТФ, мкМ	сольовий буфер*	MgCl <sub>2</sub> , мМ	Taq-полімераза
35S промотор	35S-1	0,5	200	1 <sup>x</sup>	2	1 од.
	35S-2	0,5				
Ген <i>cp 4 epsps</i>	<i>pr1</i>	1				
	<i>pr2</i>	1				
Ген <i>als</i>	<i>bvpr1</i>	0,2				
	<i>bvpr2</i>	0,2				

\*Сольовий буфер має такий склад та кінцеву концентрацію компонентів: (10 мМ Tris-HCl, рН 9,0; 50 мМ KCl; 0,01% Тритон X-100).

Наступним етапом у дослідженнях було визначення оптимальної кількості матриці ДНК для ефективно 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. Після проходження ПЛР проводили електрофорез в 1% агарозному гелі (рис. 4).



**Рис. 4. Електрофореграма мультиплексної ПЛР з визначення генів *Sp 4 epsps*, *als* та *35S* промотора.**

М – маркер молекулярної маси (*GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder*); 1–4 – ДНК гібрида 12-189/1 (розведення 50 нг; 100 нг; 150 нг; 200 нг відповідно); 5–7 – ДНК гібрида 12-189/1 (моноплекси); 8 – негативний контроль (ДНК нетрансформованого гібрида)

За використання в мультиплексних реакціях різної кількості матриці ДНК на електрофореграмі зазначено різну інтенсивність сигналів ампліконів ДНК на треках, які відповідають досліджуваним зразкам. Це свідчить про різну кількість отриманих продуктів ампліфікації. При застосуванні в ПЛР 50 нг ДНК відбувалось напрацювання невеликої кількості продуктів реакції, про що свідчить менш інтенсивний сигнал на треку, що відповідає цьому зразку. Після збільшення кількості матриці до 100 нг та 150 нг було отримано достатню кількість продуктів ампліфікації, що дає можливість встановити наявність цільових послідовностей в цих зразках. На треку, який відповідає зразку, в якому було використано 200 нг досліджуваної ДНК, зафіксовано 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 внаслідок невеликої кількості матриці для ампліфікації.

### **Висновки**

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

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

## Використана література

1. Романко С. М. Актуальні питання забезпечення екологічної безпеки сільськогосподарської продукції та реалізації законодавства про органічне виробництво. *Органічне виробництво і продовольча безпека* : матер. III Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Житомир, 23 квітня 2015 р.). Житомир : Полісся, 2015. С. 186–194.
2. Чирва І. В. Буряківництво в економіці сільськогосподарських підприємств. *Вісн. Полтавської держ. аграр. академії*. 2015. № 3. С. 186–190.
3. Федулова Т. П., Богачева Н. Н., Хуссейн А. С., Налбандян А. А. Разработка ДНК-технологий для селекции сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.). *Клеточная биология и биотехнология растений* : Междунар. науч.-практ. конф. : тезисы докладов (г. Минск, 13–15 февраля 2013 г.). Минск : Изд. центр БГУ, 2013. С. 239.
4. Левенко Б. Трансгенні культури у світі та Україні. *Вісн. НАН України*. 2011. № 9. С. 31–41.
5. Lytvyn D. I., Syvura V. V., Kurylo V. V. et al. Creation of transgenic sugar beet lines expressing insect pest resistance genes *cry1C* and *cry2A*. *Cytol Genet*. 2014. Vol. 48, Iss. 2. P. 69–75. doi: 10.3103/S0095452714020078
6. Кищенко Е. Н., Комарницкий И. К., Кучук Н. В. Получение трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium rhizogenes*. *Цитология и генетика*. 2005. Т. 39, № 1. С. 9–13.
7. Богомолова Н. М. Разработка метода получения трансгенных растений сахарной свеклы, устойчивых к гербицидам : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 06.01.05 «Селекция и семеноводство» / Всерос. НИИ сахарной свеклы и сахара им. А. Л. Мазлумова. Рамонь, 2002. – 20 с.
8. DNA cloning. Vol. III : A practical approach / D. M. Glover (ed). Oxford, Washington DC : IRL Press Ltd., 1987. 254 p.
9. Епринцев А. П., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. Воронеж : ИПЦ ВГУ, 2008. 63 с.

10. Ермилова Е. В., Залуцкая Ж. М., Лапина Т. В., Матвеева Т. В. Количественный анализ экспрессии генов. Санкт-Петербург : ТЕССА, 2010. 410 с.
11. Genetically Modified Food and Feed: Authorization in the EU. GMO Compass / GMO Database. URL: <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>
12. Роїк М. В., Сиволап Ю. М., Петюх Г. П. та ін. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Beta* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції : метод. рекомендації. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2007. 27 с.
13. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. Москва : Наука, 1981. 288 с.
14. Присяжнюк Л. М. Особливості прояву та способи оцінки генетичних конструкцій в трансгенних рослинах цукрових буряків : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : спец. 06.05.01 «Селекція і насінництво» / Ін-т біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. Київ, 2015. 26 с.
15. Акинина Г. Е., Тереняк Ю. Н., Шарыпина Я. Ю., Попов В. Н. Генетическая чистота семян – актуальный вопрос современной генетики и селекции растений. *Фактори експериментальної еволюції організмів* : зб. наук. пр. Київ : Логос, 2016. Т. 18. С. 56–60.
16. Маренкова Т. В. Изучение стабильности экспрессии чужеродных генов у трансгенных растений табака (*Nicotiniana tabacum* L.) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / Ин-т цитологии и генетики СО РАН. Новосибирск, 2005. 16 с.
17. Xu W., Zhai Z., Huang K. et al. A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, Iss. 1. e22900. doi: 10.1371/journal.pone.0022900
18. Супрун И. И., Ковалев В. С., Шиловский В. Н. Разработка мультиплексной ДНК-маркерной системы идентификации генов

устойчивости риса к пирикулярриозу *pi-40* и *pi-b*. *Научный журнал КубГАУ*. 2013. № 94. URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/19.pdf>

19. Зимина О. В., Сытник Е. С., Парий М. Ф., Алхимова Е. Г. Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров. *Biotechnologia Acta*. 2014. Т. 7, № 4. С. 80–84. doi: 10.15407/biotech7.04.080

20. Sint D., Raso L., Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol*. 2012. Vol. 3, Iss. 5. P. 898–905. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x

### References

1. Romanko, S. M. (2015). Current issues of environmental safety of agricultural products and implementation of the organic farming legislation. In *Orhanichne vyrobnytstvo i prodovolcha bezpeka: materialy III Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi konferentsii* [Organic production and food security: Collection of materials of III Int. Sci. Conf.] (pp. 186–194). April 23, 2015, Zhytomyr, Ukraine. [in Ukrainian]

2. Chyrva, I. V. (2015). Beet growing in farm economy. *Visnyk Poltavskoi derzhavnoi ahrarnoi akademii* [Bulletin of Poltava State Agrarian Academy], 3, 186–190. [in Ukrainian]

3. Fedulova, T. P., Bogacheva, N. N., Khusseyin, A. S., & Nalbandyan, A. A. (2013). The development of DNA-technologies for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding. *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rasteniy: Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya: tezisy dokladov* [Plant Cell Biology and Biotechnology: Int. Sci. Conf.: Abstracts of Papers] (p. 239). Feb 13–15, 2013, Minsk, Belarus [in Russian].

4. Levenko, B. (2011). Transgenic crops in the world and Ukraine. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* [Herald of National Academy of Sciences of Ukraine], 9, 31–41. [in Ukrainian]

5. Lytvyn, D. I., Syvura, V. V., Kurylo, V. V., Olenieva, V. D., Yemets, A. I., & Blume, Ya. B. (2014). Creation of transgenic sugar beet lines expressing insect pest resistance genes *cry1C* and *cry2A*. *Cytol Genet.*, 48(2), 69–75. doi: 10.3103/S0095452714020078

6. Kishchenko, E. N., Komarnitskii, I. K., & Kuchuk, N. V. (2005). Production of transgenic sugar beet plants (*Beta vulgaris* L.) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Tsitol Genet.* [Cytol. Genet.], 39(1), 9–13. [in Russian]

7. Bogomolova, N. M. (2002). *Razrabotka metoda polucheniya transgennykh rasteniy sakharnoy svekly, ustoychivyykh k gerbitsidam* [Development of a method for producing transgenic sugar beet plants resistant to herbicides] (Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss.). All-Russian Research Institute of Sugar Beet named after A. L. Mazlumov, Ramon, Russia. [in Russian]

8. Glover, D. M. (Ed.). (1987). *DNA cloning. Vol. III: A practical approach*. Oxford, Washington DC: IRL Press Ltd.

9. Eprintsev, A. P., Popov, V. N., & Fedorin, D. N. (2008). *Identifikatsiya i issledovanie ekspressii genov* [Identification and research of gene expression]. Voronezh: IPTs VGU. [in Russian]

10. Ermilova, E. V., Zalutskaya, Zh. M., Lapina, T. V., & Matveeva, T. V. (2010). *Kolichestvennyy analiz ekspressii genov* [Quantitative analysis of gene expression]. St. Petersburg: TESSA. [in Russian]

11. Genetically Modified Food and Feed: Authorization in the EU. GMO Compass / GMO Database. Retrieved from <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>

12. Roik, M. V., Syvolap, Yu. M., Petiukh, H. P., Shaiuk, L. V., Babiazh, A. I., & Bilous, N. V. (2007). *Vyznachennia molekuliarno-henetychnoho polimorfizmu rodu Beta L. za dopomohoiu polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii* [Research of molecular-genetic polymorphism of the genus *Beta* L. with PCR-analysis]. Kyiv: PolihrafKonsal'tynh. [in Ukrainian]

13. Osterman, L. A. (1981). *Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot. Elektroforez i ultratsentrifugirovanie* [Methods of research of proteins and

nucleic acids. Electrophoresis and ultracentrifugation]. Moscow: Nauka. [in Russian]

14. Prysiazhniuk, L. M. (2015). *Osoblyvosti proiavu ta sposoby otsinky henetychnykh konstruksii v transhennykh roslynakh tsukrovykh buriakiv* [Peculiarities of expression and evaluation methods of genetic constructs in transgenic sugar beet plants] (Cand. Agric. Sci. Diss.). Institute of bioenergy crops and sugar beet of NAAS, Kyiv, Ukraine. [in Ukrainian]

15. Akinina, G. E., Tereniak, Yu. N., Sharypina, Ya. Yu., & Popov, V. N. (2016). Genetic purity of seeds – topical question of modern genetics and plant breeding. *Fakt. eksp. evol. org.* [Factors of experimental evolution of organisms], 18, 56–60. [in Russian]

16. Marenkova, T. V. (2005). *Izuchenie stabilnosti ekspressii chuzherodnykh genov u transgennykh rasteniy tabaka (Nicotiana tabacum L.)* [Study of the stability of foreign gene expression in transgenic tobacco plants] (Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss.). Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. [in Russian]

17. Xu, W., Zhai, Z., Huang, K., Zhang, N., Yuan, Y., Shang, Y., & Luo, Y. (2012). A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS One*, 7(1), e22900. doi: 10.1371/journal.pone.0022900

18. Suprun, I. I. Kovalev, V. S., & Shilovskiy, V. N. (2013). Development of Multiplex DNA-marker set for identification of rice blast resistance genes *Pi-40* and *Pi-b*. *Naučnyj žurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Scientific Journal of KubSAU], 94. Retrieved from <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/19.pdf> [in Russian]

19. Zimina, O. V., Sytnik, E. S., Pariy, M. F., & Alkhimova, E. G. (2014). Multiplex polymerase chain reaction for genotyping of *Arabidopsis thaliana* ecotypes using SSLR markers. *Biotechnologia acta*, 7(4), 80–84. doi: 10.15407/biotech7.04.080 [in Russian]



20. Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol.*, 3(5), 898–905. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x

УДК 633.63/577.213.3

**Присяжнюк Л. М.\***, **Шитикова Ю. В.**, **Волчков А. А.** Создание мультиплексной системы ПЦР для идентификации сахарной свеклы, толерантной к воздействию глифосата

*Украинский институт экспертизы сортов растений, ул. Генерала Родимцева, 15, г. Киев, 03041, Украина, \*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net*

**Цель.** Создать мультиплексную систему для идентификации толерантной к глифосату сахарной свеклы с помощью ПЦР. **Методы.** Молекулярно-генетические методы анализа нуклеиновых кислот. **Результаты.** Приведены результаты исследований по определению параметров полимеразной цепной реакции (ПЦР) для разработки мультиплексной системы по идентификации структурных элементов трансгенной конструкции с геном *cp 4 epsps*, что обеспечивает толерантность к глифосату. Для получения ампликонов целевых последовательностей ДНК определены следующие значения температурных режимов ПЦР: шаг 1 (начальная денатурация) 95 °С – 3 мин; шаг 2 (наработка специфических продуктов реакции): денатурация 95 °С – 45 с; гибридизация праймеров 55 °С – 50 с; элонгация 72 °С – 1 мин; количество циклов – 40; шаг 3 (конечная элонгация) 72 °С – 6 мин. Проведена серия ПЦР с целью подбора оптимального количества матрицы ДНК для эффективной оценки трансгенных растений сахарной свеклы при наличии специфических последовательностей. **Выводы.** Для идентификации трансгенной сахарной свеклы, толерантной к воздействию глифосата, целесообразно определять в отдельных генотипах 35S промотор и ген *cp 4 epsps*. Установлено, что при подборе температурных параметров мультиплексной реакции на идентификацию гена *als* не влияло увеличение температуры гибридизации

праймеров на 5 °С, что позволило включить специфические праймеры для определения этой последовательности в качестве внутреннего контроля. По результатам пробных мультиплексных реакций определены концентрации дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфатов) и ионов Mg<sup>2+</sup>, которые позволили исключить возможность получения неспецифических фрагментов и ложноотрицательных результатов. Определено оптимальное количество матрицы ДНК (100–150 нг) для эффективной оценки трансгенных растений сахарной свеклы при наличии специфических последовательностей. Полученные результаты позволили разработать мультиплексную тест-систему для идентификации трансгенной сахарной свеклы, толерантной к воздействию глифосата, с помощью которой можно одновременно определить 35S промотор, ген *cp 4 epsps* и ген *als* в качестве внутреннего контроля реакции.

**Ключевые слова:** ген *cp 4 epsps*, 35S промотор, трансгенная сахарная свекла, параметры амплификации.

UDC 633.63/577.213.3

**Prysiashniuk L. M.\***, **Shytikova Yu. V.**, **Volchkov O. O.** Development of multiplex PCR system for identification of glyphosate-tolerant sugar beet

*Ukrainian Institute for Plant Variety Examination, 15 Henera Rodymtseva Str., Kyiv, 03041, Ukraine, \*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net*

**Purpose.** To create a multiplex system for identification glyphosate-tolerant sugar beet by using PCR. **Methods.** Molecular genetic analysis. **Results.** The article presents the results of studies to determine the parameters of the polymerase chain reaction (PCR) in order to develop a multiplex system for identification of the structural elements of the design of transgenic gene *cp 4 epsps*, which provides tolerance to glyphosate. For amplicon target DNA sequences, the following values of temperature conditions of PCR were determined: step 1 (initial denaturation) 95 °C – 3 min; step 2 (specific reaction products accumulation): denaturation 95 °C – 45 s; hybridization of primers 55 °C – 50 s; elongation 72 °C – 1 min; number of

cycles – 40; step 3 (final elongation) 72 °C – 6 min. A series of PCR were carried out for the purpose of selecting the optimal amount of DNA matrix for efficient estimate of transgenic sugar beet plants for the presence of specific sequences.

**Conclusions.** To identify transgenic glyphosate-tolerant sugar beet, it is advisable to determine 35S promoter and gene *cp 4 epsps* in individual genotypes. It was found that during the selection of temperature parameters of multiplex reaction a 5 °C rise in primer hybridization temperature did not affect the identification of gene *als* that allowed to include specific primers for determination of this sequence as an internal control. Based on the results of test multiplex reactions, concentrations of dNTPs and Mg<sup>2+</sup> ions were determined that allowed to exclude the possibility of non-specific fragments and false-negative results. The optimum amount of matrix DNA (100–150 ng) for an efficient estimate of transgenic sugar beet plants for the presence of specific sequences was determined. Obtained results allowed to develop a multiplex test system for identification of transgenic glyphosate-tolerant sugar beet which can be used for simultaneous determination of the 35S promoter, *cp 4 epsps* gene and *als* gene as an internal reaction control.

**Keywords:** *gene cp 4 epsps, 35S promoter, the transgenic sugar beet, amplification parameters.*