

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Збірник наукових праць

ТОМ 7

Присвячено

*200-річчю від дня народження
Чарльза Роберта Дарвіна
125-річчю від дня народження
І.І. Шмальгаузена*

Київ
ЛОГОС
2009

ББК 28.02я43

Ф18

УДК 578.08.631.52

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор); Дубров-на О.В.— д-р біол. наук (заст. головного редактора); Барилка І.Р.— д-р мед. наук; Блюм Я.Б.— д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М.— канд. біол. наук; Гребя Ю.Ю.— академік НАНУ; Єльська Г.В.— д-р біол. наук, академік НАНУ; Кучук М.В.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Дялько І.І.— канд. біол. наук; Лукаш Л.Д.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Мальота С.С.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г.— д-р с.-г. наук, чл.-кор. УААН; Моргун В.В.— д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М.— д-р біол. наук, академік УААН; Созінов О.О.— д-р біол. наук, академік НАНУ, академік УААН

Затверджено до друку рішенням

*вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
(протокол №5 від 21 квітня 2009 р.)*

Ф18

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр./ НАН України, УААН, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.].— К.: Логос, 2003–2009.

Т. 7: Присвяч. 200-річчю від дня народж. Чарльза Роберта Дарвіна, 125-річчю від дня народж. І.І. Шмальгаузена.— 2009.— 446 с.: іл.— Укр., рос.

ISBN 978-966-171-175-3 (Т.7)

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 200-річчю від дня народження Ч. Дарвіна та 125-річчю від дня народження І.І. Шмальгаузена. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетико-біологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарсько-цінних ознак рослин і тварин, сучасних методів біо-технології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технології і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації.

ББК 28.02я43

ISBN 978-966-171-175-3 (Т.7)

© Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2009

Methods of introduction into aseptically culture, *in vitro* cultivation and clonal propagation of shoots and methods of callus culture have been elaborated for medicinal plant species *Psoralea dyschroa* Vunge (Leguminosae). Nodular roots have been induced in leaf explants using *A. rhizogenes*-mediated genetic transformation. All these types of aseptically cultures are studied as a possible source of biologically active compounds.

БЕРДИЧЕВЦЕВ И.Н., ГОРЛУКОВА М.А., ШИШИЛАВИЛИИ Х.Р.,
СИНДАРОВСКАЯ Я.Р., ШЕДУЛЬКО Ю.В., ФАДЕЕВ В.С.,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: i_berdichevets@nordvox.ru;
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заводного, 148, e-mail: sindarovskaya@ukr.net

ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Важным этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный отбор первичных трансформантов, содержащих в геноме вставку целого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для этого является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач и провести несколько полиморфных цепных реакций, условия для каждой из которых необходимо подбирать индивидуально, что в конечном итоге занимает достаточно много времени. В связи с этим оптимизация условий ПЦР для эффективного отбора и анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Известно, что вставка трансгена в геном растения-реципиента довольно редко происходит. Поэтому для трансформации используются векторы с маркерными генами, экспрессия которых обеспечивает толерантность трансформантов к селективному давлению. Присутствие селективного агента в среде культивирования повышает эффективность отбора предположительно трансформантов и значительно сокращает объем работы. Наибольшее распространение получили маркерные гены, обеспечивающие устойчивость к таким селективным агентам как антибиотик или гербицид, например *trp⁺* ген, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрипину — действующему началу гербицида с коммерческим названием «Баста». Однако, следует отметить, что для ряда видов растений селекционное давление негативно сказывается на процессах каллусо- и морфогенеза, поэтому зачастую приходится либо использовать меньшие концентрации селективного агента, либо вообще на ранних этапах не использовать селективный агент [1]. Это может приводить к отбору ложных трансформантов, способных расти на селективных средах. ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям селективных генов, позволяет провести анализ растений-ре-

генерантов и исключить ложные трансформанты из эксперимента уже на начальных стадиях их появления.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых методов трансформации растений является перенос генов с помощью агробактерий. Известно, что агробактерии способны сохранять в сосудистой системе растений в течение нескольких поколений. Присутствие агробактерий в растительных образцах также может привести к ложноположительным результатам — могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Поэтому для того, чтобы доказать, что амплификации последовательностей исследуемых генов происходит с геномной ДНК, а не с экспрессионного вектора или геномной ДНК агробактерий, необходимо провести амплификацию образцов с праймерами, подобранными либо к хромосомным генам агробактерий, либо к генам, присутствующим в векторной конструкции вне области Т-ДНК.

Известно, что на результат ПЦР может влиять качество препарата ДНК. Поэтому ряд авторов рекомендуют в качестве внутреннего контроля проводить амплификацию генов домашнего хозяйства (*house-keeping genes*) [2]. В работах по созданию трансгенных растений часто используются технологические гены. В частности в нашей лаборатории используется вектор переноса в растения гибридных генов: в экспрессионном векторе целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с репортерным геном [3]. ПЦР с праймерами к репортерному гену позволяет провести анализ первичных трансформантов и с высокой степенью вероятности предполагать, что отобранные будут содержать и целевые гены. Поскольку известно, что в результате переноса Т-ДНК при агробактериальной трансформации может проходить интеграция не полной последовательности Т-ДНК, весьма важно оценивать не только наличие репортерного или селективного генов, но и последовательности целевого гена.

В связи со всем вышесказанным цель наших исследований — разработка метода мультиплексной ПЦР, который позволит бы за один цикл амплификации определять в геномной ДНК растений последовательности нескольких генов.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали коллекцию первичных трансформантов табака, арабидопсиса, картофеля, томатов, салата и свеклы.

Выделение ДНК. Образцы геномной ДНК выделяли из листьев с помощью СТАВ метода.

Мультиплексная ПЦР. Праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы VectorNTI Suite 9.

Результаты и обсуждение

Для разработки метода мультиплексной ПЦР были выбраны следующие гены: селективный ген, гены домашнего хозяйства исследуемых видов трансгенных растений из коллекции лабораторий, гены вирулентности

Agrobacterium tumefaciens используемого штамма, репортерный ген, ряд целевых генов и регуляторных элементов. Праймеры к исследуемым последовательностям были подобраны таким образом, чтобы условия их амплификации были сходными, а амплифицированные фрагменты можно было эффективно разделять в агарозном геле (рисунок 1).

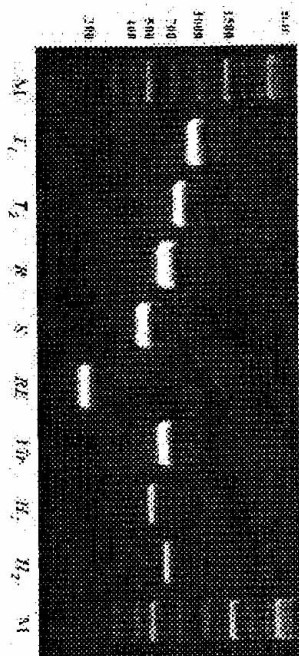


Рис. 1. Результаты амплификации генов и регуляторных элементов, использованных для разработки метода мультиплексной ПЦР. М — маркер молекулярного веса, T_1 , T_2 — целевые гены, R — репортерный ген, S — селективный ген, RE — один из используемых регуляторных элементов, Vite — ген вирулентности *Agrobacterium tumefaciens*, H_1 , H_2 — гены домашнего хозяйства.

Проведение ПЦР в достаточно широком диапазоне условий амплификации с использованием праймеров к выбранным генам позволило нам подобрать одинаковые условия реакции для каждого исследуемого гена, при которых происходит амплификация только целевой последовательности.

Первоначально подобраны условия проведения ПЦР были апробированы с использованием разной комбинации двух пар праймеров к исследуемым генам (рис. 2 а). Как видно из полученных результатов в образце геномной ДНК только одной линии трансгенных растений (линия T1) выявлены последовательности как гена селективного маркера, так и целевого гена. Отметим, что в образце геномной ДНК контрольного растения, амплификаты последовательностей селективного и целевого гена не выявлены. Для того, чтобы показать, что отсутствие последовательности целевого гена в образце геномной ДНК первичного трансформанта линии T2 не является результатом плохого качества препарата геномной ДНК была проведена мультиплексная ПЦР с использованием трех пар праймеров, в том числе и с праймерами к гену домашнего хозяйства (рис. 2 б). Как видно из представленных данных, в случае линии T2 амплификация последовательности гена домашнего хозяйства и гена селективного маркера проходит успешно, однако продукт целевого гена отсутствует (рис. 2 б). При этом, с геномной ДНК первичного трансформанта T1 амплифицируются последовательности всех исследуемых генов. Полученные результаты показывают, что уже на стадии триплексной ПЦР можно эффективно исключать из экспериментальной системы, не содержащие вставку целевого гена.

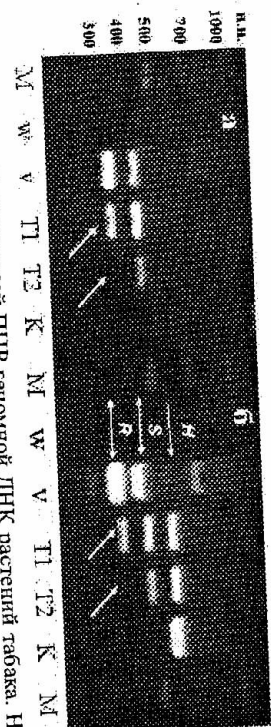


Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений табака. Н — ген домашнего хозяйства, S — селективный ген, R — репортерный ген. М — маркер молекулярного веса, w — отрицательный контроль (вместо проб ДНК использован буфер), v — экспрессионный вектор, T1, T2 — две независимые линии первичных трансформантов, K — контрольное растение.

Далее, были подобраны оптимальные соотношения каждого из праймеров системы и условия мультиплексной ПЦР, при которых происходит амплификация всех целевых последовательностей с одинаковой эффективностью (рисунок 3).

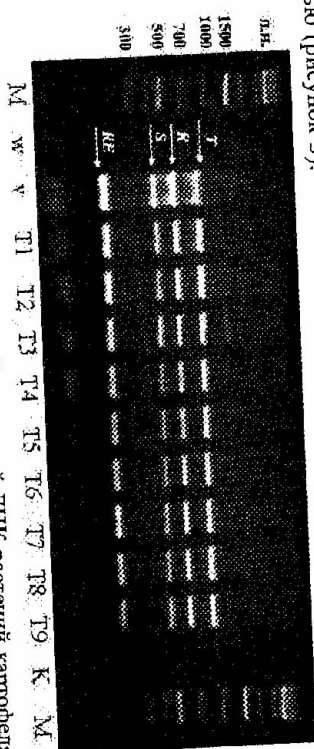


Рис. 3. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений картофеля. Т — целевой ген, R — репортерный ген, S — селективный ген, RE — один из используемых регуляторных элементов. М — маркер молекулярного веса, w — отрицательный контроль, v — экспрессионный вектор, T1-T9 — независимые линии первичных трансформантов. K — контрольное растение.

Данный подход успешно апробирован на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на коллекции трансформантов сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Выводы

Таким образом, нами разработан подход, позволяющий за одним разом ПЦР проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательностей целевых генов, селективного гена, репортерного гена, ряда регуляторных элементов, а также оценивать качество препарата, выделенной геномной ДНК, и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений.

Література

1. T. Orlowska. Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation // In: Altman A, Ziv M, Izhari S (eds). Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century, — 1999 — Kluwer, Dordrecht. — P. 185—188.
2. Maimetov M., Temning P. Screening of transgenic plants by multiplex PCR // Plant Mol. Biol. Rep. — 1997. — vol. 15 — P. 38—45.
3. Pirizian E.S., Goldenkova I.V., Matushchuk K.A., Kobets N.S., Altman I.P., Bobrysheva I.V., Chetkina I.F., Glazkova D. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the temperature sensitive lacZ gene from *Stenotrophomonas maltophilia* // Mol. Genet. Genomics. — 2002. — vol. 266. — P. 778-786.

Резюме

Розроблена система праймерів, їх оптимальные соотношения и условия мультиплексової ПЦР для ефективного отбору и дальнейшего анализа трансгенных растений. Система успешно апробирована на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Set of specific primers and multiplex PCR conditions have been developed for effective selection and analysis of transgenic plants. This methodology was approved on collection of model plants (transgenic tobacco and *Arabidopsis*) and some transgenic crops (potato, tomato, beet and lettuce).

БУСЫЛІК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПИРДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kuniakh@imbv.org.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ *UNGERSIA VISCIDIS*

Унгернія Віктора (*Ungersia viscidis* Vved. ex Aitchison, *Amaryllidaceae*) — епідемічна рослина Таджикистану та Узбекистану, препарати ізохінолінових алкалоїдів та біологічно активних полісахаридів якої застосовують для лікування широкого спектру захворювань м'язової, травної та дихальної систем [1]. Активна експлуатація природних ресурсів цього різновидного виду створює небезпеку скорочення його чисельності та зменшення генетичного різноманіття. Це зумовлює актуальність розробки шляхів прискореного розмноження та збереження генофонду виду. На сьогодні розроблено умови мікроклонального розмноження *U. viscidis* як шляхом прямої регенерації із фрагментів душок цибулин, так і шляхом індукції регенерації із калюсних тканин, що тривалий час вирощували *in vitro*. Підбрано умови мультиплікації та вирощування *in vitro* отриманих мікроцибулин-регенерантів. Розрахунково розроблений спосіб мікроклонального розмноження дозволяє отримати за 1 рік до 1 млн. мікроцибулин й інтенсифікувати їх розвиток: за 1,5-2 роки вирощування *in vitro* цибулини досягають стадії розвитку 5-7 річних рослин у природі [2].

З огляду на явище соматоклональної мінливості в культурі рослинних тканин [3], з метою перевірки можливості застосування розроблених методик для збереження генофонду виду було проведено оцінку генетичної ідентичності