



УДК 575.827:604.6:582.683.2

Л. О. Сахно, І. К. Комарницький,
член-кореспондент НАН України М. В. Кучук

Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) зі стійкістю до гербіцидів на основі гліфосату і глюфозинату

За рахунок введення в одному векторі синтетичного гена енолпіруватшикиматфосфат-синтази (надає рослинам стійкості до гліфосату) і гена фосфінотрицинацетилтрансферази (відповідає за стійкість до фосфінотрицину, або глюфозинату) шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листкових дисків асептичних рослин отримано лінії ярого ріпаку (*Brassica napus* L.), створені на основі двох районованих в Україні сортів (Ексголд і Титан). Молекулярно-біологічні аналізи показали інтеграцію генів у ядерну ДНК ріпаку. Стійкість рослин до гербіцидів Ураган Форте (діюча речовина — гліфосат) і BASTA (діюча речовина — фосфінотрицин) показана в умовах *in vitro*. Вирощування біотехнологічного ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів двох різних груп може бути більш ефективним порівняно з рослинами, в яких активним є один з таких генів, за рахунок можливості чергування гербіцидів при їх застосуванні, внаслідок чого менш ймовірним є виникнення спонтанно стійких бур'янів.

Ключові слова: *Brassica napus* L., *epsps*, *bar*, гліфосат, глюфозинат.

Стійкі до гербіцидів, найчастіше до гліфосату і глюфозинату, сільськогосподарські культури стабільно займають найбільшу частку посівних площ серед біотехнологічних культур протягом усього періоду, що їх вирощують у світі, починаючи з 1996 р. [1]. Наприклад, у 2013 р. такі сільськогосподарські культури вирощувалися на площі 99,4 млн га, що становило 57% загальної площі посівів трансгенних культур (175,2 млн га) у світовому виробництві. За перші 17 років комерціалізації (1996–2012 рр.) світовий прибуток від культивування стійких до гербіцидів сільськогосподарських культур оцінювався в 47,7 млрд доларів США, що становило 41% загального отриманого прибутку від біотехнологічних культур у розмірі 116,9 млрд доларів США. Річний прибуток від вирощування трансгенних гербіцидостійких культур (на прикладі 2012 р.) дорівнював 6,6 млрд доларів США, загальний прибуток від вирощування біотехнологічних сільськогосподарських культур становив 18,7 млрд доларів США.

© Л. О. Сахно, І. К. Комарницький, М. В. Кучук, 2015

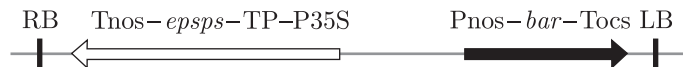


Рис. 1. Схема вектора рСВ133: RB, LB — границі Т-ДНК; Tnos — термінатор гена нопалінсинтази; Pnos — промотор гена нопалінсинтази; P35S — промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти; Tocs — термінатор гена октопінсинтази; TP — транзитний пептид; *epsps* — ген енолпірувілшикиматфосфатсинтази; *bar* — ген фосфінотрицинацетилтрансферази

Однією з шести серед комерціалізованих культур, стійких до гліфосату (*N*-фосфонометилглїцин), крім кукурудзи, сої, люцерни, цукрового буряка і бавовника, є ріпак [2]. Стійкий до гербіцидів ріпак (*Brassica napus*, так званий аргентинський ріпак) вирощують у Австралії, Канаді, Чилі, Китаї, Європейському Союзі, Японії, Мексиці, Новій Зеландії, Філіппінах, Сінгапурі, Південній Африці, Південній Кореї, США. У Канаді вирощують також трансгенні рослини *Brassica campestris* (так званий польський ріпак) [1].

У країнах ЄС зареєстровано шість трансгенних подій ріпаку — GT73 і GT200 (“Monsanto”), MS8, RF3, MS8xRF3 і T45 (“Bayer”). Події, заявлені фірмою “Монсанто”, характеризуються стійкістю до гліфосату за рахунок експресії гена 5'-енолпіруватшикиматфосфатсинтази (*epsps*) [3]. Дозвіл на їх застосування дійсний до 2017 р. [4]. Інші зареєстровані трансгенні події серед перерахованих вище мають толерантність до глюфозинату (фосфінотрицину), що її забезпечує експресія гена фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*).

Експериментам з отримання більш ефективних гербіцидостійких рослин приділяється значна увага провідними лабораторіями світу. Так, для отримання рослин ріпаку, стійких до гліфосату, використовували вектори зі зміненим амінокислотним складом ферменту EPSPS [5], що сприяло підвищенню стійкості і до гербіциду. Продовжуються дослідження по створенню рослин, здатних до деградації гліфосату в рослині шляхом експресії гліцинооксидази з бактерії *Bacillus subtilis* [6]. Отримано рослини ріпаку з одночасною стійкістю до гліфосату і триазинів (Triazine tolerant Roundup Ready canola, подія MONO0894, “Monsanto”) [7].

Метою нашого дослідження було створення нових трансгенних подій ріпаку на основі районованих в Україні сортів з використанням синтетичного гена *epsps* і гена *bar* для отримання рослин, одночасно стійких до гербіцидів, діючими речовинами яких є гліфосат і глюфозинат. Вирощування біотехнологічного ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів двох різних груп може бути більш ефективним порівняно з рослинами, в яких активним є один з таких генів, за рахунок можливості чергування гербіцидів при їх застосуванні, внаслідок чого зменшується ймовірність виникнення спонтанно стійких дикорослих рослин.

Матеріали і методи. Як вихідний матеріал використовували культивовані в асептичних умовах (температура +23 °С, освітлення 4000–5000 лк при 14/10 год (світло/темрява) фотоперіоді) рослини двох промислових сортів ярого ріпаку — Титан і Ексголд. Насіння люб'язно надано с. н. с. відділу селекції і насінництва льону та ріпаку Національного наукового центру “Інститут землеробства УААН” М. В. Слісарчуком. Трансформацію з використанням *Agrobacterium tumefaciens* проводили за розробленою нами раніше методикою [8]. В експериментах використовувався створений нами вектор рСВ133 (рис. 1). Він сконструйований на основі вектора рUC19 з колекції Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України шляхом ексцизації гена *gus* і лігування гена *epsps* під контроль 35S промотору. Як селективний у конструкції задіяний ген *bar*, що надає рослинам стійкості до фосфінотрицину (глюфозинату).

Інтеграцію чужорідних генів у рослинний геном визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Загальну ДНК з імовірно трансгенних рослин виділяли з листкової тканини згідно з методикою, запропонованою W. Y. Cheung зі співавт. [9]. Для реакції використовували 40 нг ДНК рослинного зразка, по 0,5 мкМ відповідних праймерів, по 200 мкМ кожного з трифосфатів, 1 од. *Taq* ДНК-полімерази, ПЛР реакційний буфер, який мав у своєму складі 50 мМ KCl, 10 мМ *trис*-HCl (pH 9 при 25° C), 0,1% Triton X-100 і 2 мМ MgCl₂. Загальний об'єм суміші дорівнював 20 мкл. Для ідентифікації генів *epsps* і *bar* використовували пари праймерів 5'-gctgactcctcgagttcaag-3' і 5'-tcgaatctagactcatcagg-3' та 5'-atgagcccagaacgacgcccggcc-3' і 5'-cagatctcggtgacgggcaggac-3' відповідно, що ампліфікують фрагменти завдовжки 498 і 551 п. н. Ізольована ДНК з нетрансформованих рослин (негативний контроль) і 1 нг плазмідного вектора pCB 133 (позитивний контроль) були ампліфіковані з тими ж праймерами і за тих самих умов. Реакцію проводили в ампліфікаторі "Mastercycler personal" ("Eppendorf", Німеччина). Використовувались такі профілі для обох генів: 94 °C — 1 хв, 35 циклів: 94 °C — 1 хв, 62 °C — 1 хв, 72 °C — 30 с, потім 4 хв при 72 °C. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі в *trис*-ацетатній буферній системі.

Тестування на стійкість до гліфосату і глюфозинату в асептичних умовах проводили, вирощуючи ПЛР-позитивні рослини на поживних агаризованих безгормональних середовищах MS [10] з додаванням фосфометилгліцину (2,5 мг/л) або фосфінотрицину (10 мг/л) відповідно у MagentaTM Vox за умов термальної кімнати (фотоперіод світло/темрява — 14/10 год, температура +23 °C, освітленість — 4000–5000 лк). Стерильні розчини гербіцидів додавали до середовищ після автоклавування. Оцінювали коренеутворення і загальний стан рослин за три тижні. Вимірювали приріст сирової біомаси рослин, вирощених на середовищах з гербіцидами і без них. Визначали сумарний розчинний білок у листках за М. М. Bradford [11], оцінюючи екстракти, отримані після розтирання в пробірках на шаровому млині Retsch MM 400 (Німеччина) у 50 мМ *trис*-HCl (pH 8,0) буфері і центрифугування при 13 000 g (4 °C) протягом 15 хв, на фотометрі BioPhotometer ("Eppendorf") v.1.35. при довжині хвилі 595 нм. Як внутрішній стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. Експерименти повторювали тричі, в кожному повторі для тестування однієї лінії брали п'ять рослин.

Результати і обговорення. У результаті експериментів з вектором pCB133 (див. рис. 1) отримано 11 незалежних ліній ріпаку двох промислових ярих сортів, з них 7 ліній на основі сорту Ексолд і 4 лінії на основі сорту Титан. Селекцію трансформантів проводили на регенераційних середовищах з фосфінотрицином (PPT, 5 мг/л). Можлива селекція і з використанням фосфометилгліцину [12], але в наших експериментах вона виявилася більш тривалою порівняно з відбором на середовищах з PPT.

Введення синтетичного гена *epsps* і гена *bar* показано за допомогою ПЛР (рис. 2). Ампліфікація фрагментів завдовжки 498 п. н. (ген *epsps*) і 551 п. н. (ген *bar*) виявлена для трансгенних ліній, тоді як у вихідних рослин її не задетектовано.

Відібрані за допомогою молекулярно-біологічних аналізів лінії ріпаку були розмножені *in vitro* живцюванням і проаналізовані на стійкість до гліфосату і фосфінотрицину в асептичних умовах. Вихідні рослини жовтіли і не росли, коріння не утворювалося (рис. 3). Дія глюфозинату виявилася більш жорсткою не тільки на етапі регенерації, але і на рівні сформованої рослини: загибель нетрансформованих рослин була очевидна вже за тиждень пересадки на середовище з PPT. Трансформанти розвивалися нормально, впливу гербіцидів

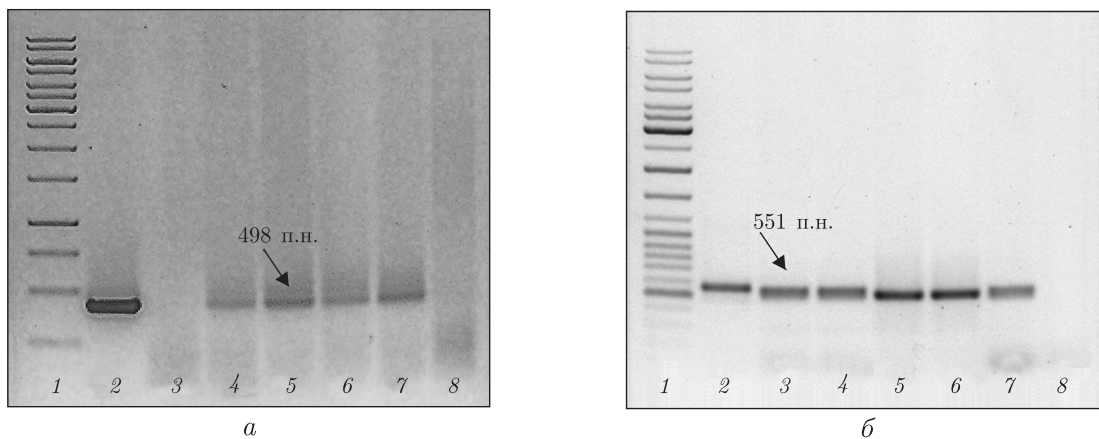


Рис. 2. Результати ПЛР на наявність генів *epsps* (а) і *bar* (б) у ядерній ДНК трансформованих рослин ріпаку сортів Ексголд і Титан:

а: 1 — маркер молекулярної маси; 2 — ДНК вектора рСВ133; 3 — негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини ріпаку; 4–7 — незалежні трансгенні лінії;

б: 1 — маркер молекулярної маси; 2 — ДНК вектора рСВ133; 3–7 — незалежні трансгенні лінії; 8 — негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини ріпаку

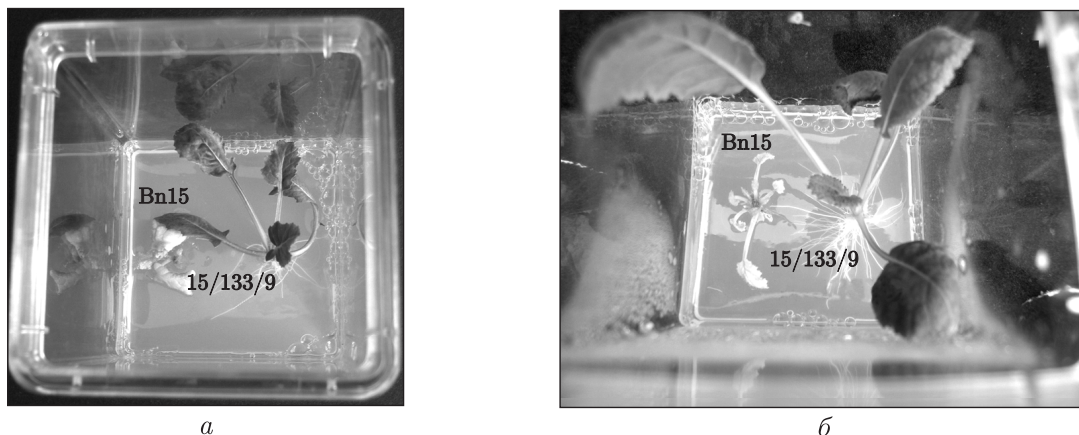


Рис. 3. Рослини контрольної (Bn15, сорт Ексголд) і трансгенної (Bn15/133/9) ліній ріпаку після трьох тижнів росту на безгормональному середовищі з гліфосатом (2,5 мг/л, препарат “Ураган Форте”) (а) і фосфінотрицином (б)

у використаних концентраціях, які відповідають рекомендованим для обробки фірмами-виробниками, виявлено не було.

Загальна біомаса і вміст сумарного розчинного білка в листках трансгенних рослин, що вирощувалися на середовищах з додаванням гербіцидів і без них, статистично не відрізнялися як між собою, так і від вихідних рослин при їх вирощуванні без додавання гербіцидів (табл. 1). Подібні результати були одержані і в наших експериментах по отриманню рослин ріпаку з експресією гена *bar*, коли у векторі він був представлений кодуючою послідовністю з термінатором, але без промоторної частини [8]. При отриманні рослин тютюну з трансгеном *sup11A1* як контрольні використовували нетрансформовані рослини і трансгенні, що несли тільки селективний ген *bar*, при цьому не спостерігали відмінностей у темпах росту і накопиченні біомаси між двома останніми групами рослин [13].

Таблиця 1. Приріст біомаси і сумарний розчинний білок (СРБ) у листках асептично вирощених тритижевих рослин ріпаку

Назва лінії	Приріст сирової маси, г			СРБ, мг/г сирової маси		
	Без гербіцидів	PPT	Гліфосат	Без гербіцидів	PPT	Гліфосат
Bn15*	2,52 ± 0,1	0	0	24,15 ± 1,3	Н. в.	Н. в.
15/133/2	2,49 ± 0,3	2,46 ± 0,5	2,47 ± 0,6	23,86 ± 1,5	23,74 ± 1,2	23,96 ± 1,4
15/133/3	2,45 ± 0,5	2,48 ± 0,4	2,46 ± 0,3	24,2 ± 0,9	23,96 ± 1,1	24,1 ± 0,8
15/133/4	2,51 ± 0,4	2,49 ± 0,5	2,48 ± 0,5	24,03 ± 1,1	23,84 ± 1,2	23,76 ± 1,2
15/133/5	2,48 ± 0,2	2,46 ± 0,6	2,47 ± 0,4	23,92 ± 1,2	24,12 ± 1,1	23,88 ± 1,3
15/133/6	2,48 ± 0,1	2,49 ± 0,2	2,46 ± 0,4	24,25 ± 1,3	23,96 ± 1,3	23,82 ± 1,4
15/133/8	2,52 ± 0,2	2,51 ± 0,1	2,48 ± 0,6	23,8 ± 0,9	24,12 ± 1,3	23,81 ± 1,1
15/133/9	2,49 ± 0,6	2,49 ± 0,3	2,46 ± 0,5	24,1 ± 0,9	23,82 ± 1,5	23,78 ± 1,1
Bn17**	2,48 ± 0,4	2,49 ± 0,4	2,45 ± 0,4	23,96 ± 1,2	23,87 ± 1,8	23,78 ± 1,1
17/133/1	2,48 ± 0,1	2,46 ± 0,4	2,45 ± 0,2	24,12 ± 1,1	23,78 ± 1,3	23,9 ± 1,4
17/133/2	2,51 ± 0,5	2,48 ± 0,5	2,46 ± 0,3	24,05 ± 0,9	23,76 ± 1,1	23,98 ± 1,1
17/133/4	2,49 ± 0,4	2,45 ± 0,4	2,48 ± 0,4	23,85 ± 1,1	23,7 ± 1,5	23,65 ± 1,4
17/133/5	2,51 ± 0,1	2,48 ± 0,2	2,46 ± 0,4	24,15 ± 1,2	23,84 ± 1,6	23,9 ± 1,1

Примітка. Н. в. — не визначали через загибель рослин. *Сорт Ексголд, контроль. **Сорт Титан, контроль.

Таким чином, отримано 11 незалежних біотехнологічних ліній ріпаку двох промислових ярих сортів, районованих в Україні. Вони поєднують в собі стійкість, яка підтверджена при вирощуванні в асептичних умовах, до гербіцидів на основі фосфінотрицину (BASTA) за рахунок експресії гена *bar* і гербіцидів на основі *N*-фосфометилгліцину (Roundup) завдяки функціонуванню синтетичного гена *epsps*.

Цитована література

1. <https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/10/default.asp>.
2. Green J. M. Evolution of glyphosate-resistant crop technology // Weed Science. – 2009. – **57**, No 1. – P. 108–117.
3. WO02/36831. Canola event *pv-bngt04* (rt73) and compositions and methods for detection thereof / R. Krieb, Q. Zeng. – PCT filed Oct. 22, 2001; PCT publ. Date May 10, 2002.
4. EU register of genetically modified food and feed. Oilseed rape GT73. Art. 8(1)(a), (b) and 20(1)(b) of the Regulation (EC) No 1829/2003. Article 19(3) of Directive 2001/18/EC.
5. Kahrizi D., Salmanian A. H., Afshari A. et al. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate // Plant Cell Rep. – 2007. – **26**, No 1. – P. 95–104.
6. Nicolia A., Ferradini N., Molla G. et al. Expression of an evolved engineered variant of a bacterial glycine oxidase leads to glyphosate resistance in alfalfa // J. Biotechnol. – 2014. – **184**. – P. 201–208.
7. <http://roundupreadycanola.com.au/wp-content/uploads/2014/03/What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola1.pdf>.
8. Сахно Л. А., Гочева Е. А., Комарницький И. К., Кучук Н. В. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 21–28.
9. Cheung W. Y., Hubert N., Landry B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Methods Appl. – 1993. – **3**, No 1. – P. 69–70.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – **15**, No 3. – P. 473–497.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle to protein dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.

12. Wang J. X., Zhao F. Y., Xu P. Use of *aroA-M1* as a selectable marker for *Brassica napus* transformation // Crop Sci. – 2006. – **46**, No 2. – P. 706–711.
13. Spivak S. G., Berdichevets I. N., Yarmolinsky D. G. et al. Construction and characteristics of transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* L. plants expressing *CYP11A1* cDNA encoding cytochrome P450_{SCC} // Russ. J. Genet. – 2009. – **45**, No 9. – P. 1067–1073.

References

1. <https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/10/default.asp>.
2. Green J. M. Weed Science, 2009, **57**, No 1: 108–117.
3. WO02/36831 Canola event *pv-bngt04* (rt73) and compositions and methods for detection thereof, R. Krieb, Q. Zeng, PCT filed Oct. 22, 2001; PCT publ. Date May 10, 2002.
4. EU register of genetically modified food and feed. Oilseed rape GT73. Art. 8(1)(a),(b) and 20(1)(b) of the Regulation (EC) No 1829/2003, Article 19(3) of Directive 2001/18/EC.
5. Kahrizi D., Salmanian A. H., Afshari A. et al. Plant Cell Rep, 2007, **26**, No 1, P. 95–104.
6. Nocolia A., Ferradini N., Molla G. et al. J. Biotechnol, 2014, **184**: 201–208.
7. <http://roundupreadycanola.com.au/wp-content/uploads/2014/03/What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola1.pdf>
8. Sakhno L. A., Gocheva E. A., Komarnitskii I. K., Kuchuk N. V. Cytol. Genet., 2008, **42**, No 1: 21–28 (in Russian).
9. Cheung W. Y., Hubert N., Landry B. S. PCR Method Appl., 1993, **3**, No 1: 69–70.
10. Murashige T., Skoog F. Physiol Plant, 1962, **15**, No 3: 473–497.
11. Bradford M. M. Anal. Biochem, 1976, **72**: 248–254.
12. Wang J. X., Zhao F. Y., Xu P. Crop Sci, 2006, **46**, No 2: 706–711.
13. Spivak S. G., Berdichevets I. N., Yarmolinsky D. G. et al. Russ. J. Genet., 2009, **45**, No 9: 1067–1073.

Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ

Надійшло до редакції 05.05.2015

Л. А. Сахно, І. К. Комарницький,
член-кореспондент НАН України **Н. В. Кучук**

Получение растений рапса (*Brassica napus* L.), устойчивых к гербицидам на основе глифосата и глюфофината

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

За счет введения в одном векторе синтетического гена энолпируваткина-матричного фосфатсинтазы (обеспечивает устойчивость растений к глифосату) и гена фосфинотрицинацетилтрансферазы (отвечает за устойчивость растений к фосфинотрицину, или глюфофинату) путем *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков асептических растений получены линии ярового рапса (*Brassica napus* L.), созданные на основе двух районированных в Украине сортов (Эксголд и Титан). Молекулярно-биологические анализы показали интеграцию генов в ядерную ДНК рапса. Устойчивость растений к гербицидам Ураган Форте (действующее вещество — глифосат) и BASTA (действующее вещество — фосфинотрицин) показана в условиях *in vitro*. Выращивание биотехнологического рапса с одновременной экспрессией генов устойчивости к гербицидам двух разных групп может быть более эффективным по сравнению с растениями, у которых активен только один из таких генов, за счет возможности чередования гербицидов при обработке, ввиду чего менее вероятно возникновение спонтанно устойчивых сорняков.

Ключевые слова: *Brassica napus* L., *epsps*, *bar*, глифосат, глюфофинат.

L. O. Sakhno, I. K. Komarnitskii,

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. V. Kuchuk**

Obtaining canola (*Brassica napus* L.) plants resistant to both glyphosate and glufosinate herbicides

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

*The biotechnological lines of spring canola (*Brassica napus* L.) have been created due to the introduction of both synthetic enolpyruvate shikimate phosphate syntase gene and phosphinothricin acetyl transferase gene, which are responsible for the plant resistance to glyphosate and phosphinothricin, or glufosinate, respectively, in the same vector using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf disks of aseptic plants of two released Ukrainian varieties (Ergold and Titan). Molecular biological analyses showed the target gene integration into canola's nuclear DNA. Resistance to Hurricane Forte, as well as BASTA herbicides, was proved under in vitro conditions. The glyphosate and phosphinothricin worked as active agents in the mentioned herbicides, respectively. The planting of biotechnological canola plants that simultaneously express resistance genes to herbicides from two different groups may be more effective in comparison with plants, which possess only one of such genes because of the opportunity of herbicide interchange under the applications. It decreases the probability of the emergence of spontaneously tolerant weeds.*

Keywords: *Brassica napus* L., *epsps*, *bar*, glyphosate, glufosinate.