

УДК 575.827:604.6:582.683.2

СТІЙКІСТЬ ДО ГЛІФОСАТУ І ГЛЮФОЗІНАТУ В ПОКОЛІННЯХ T₁-T₂ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS* L.)

Л.О. САХНО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148

e-mail: sakhno@icbge.org.ua

Мета. Отримати біотехнологічні рослини ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar*, які введені в одному векторі, і дослідити успадкування чужорідних генів і стійкість до відповідних гербіцидів у поколіннях T₁-T₂. **Методи.** Генетична трансформація з використанням *Agrobacterium tumefaciens*, молекулярно-біологічні (ПЛР, ЗТ-ПЛР), генетичний (виявлення розщеплення за ознакою стійкості до фосфінотрицину в асептичних умовах), фізіологічний (виявлення стійкості до гербіцидів, визначення біомаси і сумарного розчинного білка (СРБ)). **Результати.** Отримано трансгенні рослини ріпаку з генами стійкості до гербіцидів на основі гліфосату (*epsps*) і глюфозінату (*bar*). Показано введення чужорідних генів у ядерну ДНК і їхню активність на рівні транскрипції. Підтверджено стійкість біотехнологічних рослин до дії гербіцидів при обробці у теплиці. Виявлено стабільне і зчеплене успадкування введених трансгенів. Показано, що трансгенні рослини, вирощені в умовах закритого ґрунту і не оброблені гербіцидом, не відрізняються від вихідних нетрансформованих за біомасою і вмістом СРБ у листках. Виявлено, що обприскування гербіцидами не впливає на темпи росту біотехнологічних рослин, біомасу і СРБ. **Висновки.** Отримано біотехнологічні рослини ріпаку, які мають у ядерному геномі гени стійкості до гербіцидів на основі гліфосату (*epsps*) і глюфозінату (*bar*). Експресію трансгенів підтверджено у поколіннях T₁-T₂. Вона не впливає на накопичення біомаси і вміст СРБ у отриманих рослин в умовах закритого ґрунту.

Ключові слова: *Brassica napus* ріпак, *epsps*, *bar*, гліфосат, глюфозінат.

Вступ. Гербіциди – це хімічні сполуки, які пригнічують або повністю зупиняють ріст рослин. Вони є складовою системи контролю росту бур'янів, що зменшують врожай сільськогосподарських культур.

Діючою речовиною гербіциду Roundup®, що його випускає фірма Monsanto, є N-фосфометилгліцин (гліфосат) (рис. 1, а). Він впливає на метаболічний шлях шикімової кислоти, блокуючи синтез деяких незамінних ароматичних амінокислот [1], перед усім у точках росту стебла і кореня. Чутливий до гліфосату шлях метаболізму шикімової кислоти є в клітинах бактерій, грибів, водоростей, рослин, протозоа, але він відсутній у комах, риб, птахів, ссавців. Тому гліфосат є безпечним для людини та інших організмів, у яких немає специфічної мішені – ферменту 5-енолпіруватшкімат-3-фосфат синтази (EPSPS).

Досягти стійкості трансгенних рослин до дії гліфосату можна декількома способами: 1) за рахунок забезпечення надлишкового рівня ферменту EPSPS у рослині; 2) шляхом введення в рослину мутантного гена *epsps*, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосату; 3) шляхом введення гена, що забезпечує деградацію гербіциду в рослині. Найуспішнішим виявив-

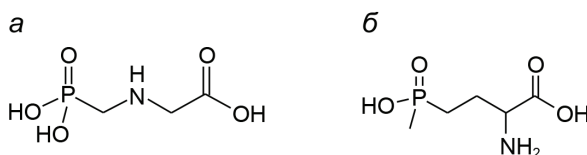


Рис. 1. Хімічна структура молекул гліфосата (а) і глюфозіната (б)

© Л.О. САХНО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, М.В. КУЧУК, 2015

ся другий напрямок. Ген, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосату і, таким чином, не інгібується, було виділено з агробактерії штаму *CP4* і названо *CP4epsps*. У трансгенній рослині він забезпечує стійкість до дії гербіциду, повністю компенсуючи функцію нативного рослинного ферменту EPSPS, що її блокує гліфосат.

Стойкість трансгенних рослин ріпаку Roundup Ready до гліфосату продемонстровано у польових тестах у 1992 р. і додаткових польових випробуваннях, які були проведені в усіх регіонах вирощування у США, Канаді, Європі і Австралії [2]. Ці рослини були вперше посіяні з комерційною метою у 1996 році у Канаді. На сьогодні толерантний до гербіцидів ріпак (*Brassica napus*, т.з. аргентинський ріпак) вирощують у Австралії, Канаді, Чилі, Китаї, Європейському Союзу, Японії, Мексиці, Новій Зеландії, Філіппінах, Сінгапурі, Південній Африці, Південній Кореї, США. У Канаді вирощують також трансгенні рослини *Brassica rapa* (раніше *campestris*) (т.з. польський ріпак) [3].

Діючою речовиною гербіцидів, які виробляють фірми Bayer – Basta®, Rely®, Finale®, Ignite®, Challenge® і Liberty®, є фосфінотрицин (PPT, глюфозінат) (рис. 1, б). Він інгібує глютамін синтазу [4], яка відіграє ключову роль у асиміляції аміаку і регуляції метаболізму азоту в рослині. При застосуванні PPT азотний метаболізм у тканинах порушується, і аміак накопичується в токсичних кількостях. Аміак продукується під час реакцій, які пов'язані з фотосинтетичним електронним транспортом, його накопичення зростає при наявності світла. У цих умовах чутливість рослинних тканин до фосфінотрицину збільшується. Стойкість трансгенних рослин до глюфозінату забезпечується за рахунок експресії фосфінотрицин ацетилтрансферази (PAT), яка кодується геном *bar* із *Streptomyces hygrosopicus* або *pat* із *Streptomyces viridochromogenes*.

Експериментам з отримання ефективніших гербіцидостійких рослин приділяється значна увага провідними лабораторіями світу. Так, для створення рослин ріпаку, стійких до гліфосату, використовували вектори зі зміненим амінокислотним складом ферменту EPSPS [6, 7], що дозволяло підвищити стійкість до гербіциду. Продовжуються дослідження із отримання рослин, здатних до деградації гліфосату в рослині шляхом експресії гліцинооксидази з бактерії *Bacillus subtilis* [8]. Існує

тенденція до створення нових сортів гербіцидостійких сільськогосподарських культур зі стійкістю до декількох гербіцидів одночасно [9]. Отримано рослини ріпаку з одночасною стійкістю до гліфосату і триазинів (Triazine tolerant Roundup Ready canola, подія MONO0894, Monsanto) [10].

Метою нашої роботи було отримання нових трансгенних подій ріпаку, одночасно стійких до гербіцидів, діючими речовинами яких є гліфосат і глюфозінат, на основі районованих в Україні сортів із використанням синтетичного гена *epsps* і гена *bar*, та оцінка експресії і успадкування введених трансгенів. Вирощування біотехнологічного ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів двох різних груп може бути ефективнішим порівняно з рослинами, у яких активним є один із таких генів, за рахунок можливості чергування гербіцидів при їхньому застосуванні, що робить менш ймовірним виникнення спонтанно толерантних дикорослих рослин.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Як вихідний матеріал використовували культивовані в асептичних умовах (температура +23°C, освітлення 4000 – 5000 лк при 14/10 год (світ/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.

Генетичну трансформацію з використанням *Agrobacterium tumefaciens* проводили за розробленою нами раніше методикою [11], використовуючи як екпланти листові сегменти рослин, культивованих у асептичних умовах. В експериментах був задіяний створений нами вектор pCB133 (рис. 2). Він сконструйований на основі вектора pUC19 з колекції ІКБГІ НАНУ шляхом ексцизії гена *gus* і лігування гена *epsps* під контроль 35S промо-



Рис. 2. Схема вектора pCB133: RB, LB – границі T-ДНК, Tnos – термінатор гена нопалінсинтази, Pnos – промотор гена нопалінсинтази, P35S – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капуста, Tocs – термінатор гена октопінсинтази, TP – транзитний пептид, *epsps* – ген енолпірувілшкімат фосфатсинтази, *bar* – ген фосфінотрицин ацетилтрансферази

тору. Як селективний у конструкції задіяний ген *bar*, що надає рослинам стійкості до фосфінотрицину (глюфозінату).

Інтеграцію чужорідних генів у рослинний генотип визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Загальну ДНК з ймовірно трансгенних рослин виділяли з листкової тканини за методикою Cheung et al. [12]. 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 Трис-НСІ (рН 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'-gctgactcctcgagtcaag-3' і 5'-tcgaatctagactcatcagg-3' та 5'-atgagcccagaacgacgccgccc-3' і 5'-cagatctcggtagcggcgaggac-3', відповідно, що ампліфікують фрагменти довжиною 498 і 551 п.н. Ізольована ДНК із нетрансформованих рослин (негативний контроль) і 1 нг плазмідного вектора рСВ 133 (позитивний контроль) були ампліфіковані з тими ж праймерами і за тих же умов. Реакцію проводили в ампліфікаторі «Mastercycler personal» («Eppendorf», Німеччина). Використовували такі програми для обох генів: 94° – 1 хв, 35 циклів: 94° – 1 хв, 62° – 1 хв, 72° – 30 сек, потім 4 хв при 72°. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорузу в 1,5 %-ному агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі.

ЗТ-ПЛР. Для підтвердження експресії генів на рівні транскрипції проводили ПЛР аналіз зворотних транскриптів (ЗТ-ПЛР) із використанням сумарної РНК. Її виділяли з листків рослин за методикою [13]. Для аналізу брали 200 мг рослинного матеріалу. Концентрацію РНК вимірювали на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Синтез першого ланцюга кДНК на матриці РНК проводили з використанням набору для проведення ЗТ-ПЛР «First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas») згідно інструкціям фірми-виробника. РНК-матрицю попередньо обробляли дезоксирибонуклеазою I. Для кожного зразка РНК проводили дві реакції – з додаванням і без додавання зворотної транскриптази М-MuLV. Ампліфікацію і аналіз ПЛР-продуктів виконували, як описано вище.

Для визначення вмісту сумарного розчинного білка (СРБ) у листках рослин використовували

метод Бредфорда [14]. Рослинні екстракти готували, розтираючи наважку в пробірках на шаровому млині Retsch MM 400 (Німеччина) в потрібному об'ємі 50 мМ Трис-НСІ буфера (рН 8,0) з подальшим центрифугуванням при 13 000 g (4°C) протягом 15 хв. Рідину над осадом використовували для аналізу. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 при довжині хвилі 595 нм. Як внутрішній стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Тестування на стійкість до гербіцидів в умовах закритого ґрунту. Проводили обприскування 3-тижневих адаптованих рослин розчином гліфосату (*N*-фосфометилгліцину 2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»), дію препарату спостерігали за тиждень. Дію препарату BASTA (20 % розчин фосфінотрицину) спостерігали за три доби після обприскування водним розчином (5 мг/л діючої речовини).

Для отримання насіння рослини з асептичної культури переносили у ґрунт в умовах теплиці. За настання цвітіння відбувалось самозапилення, використовували паперові ізолятори.

Генетичний аналіз. Насіння ріпаку, отримане в результаті самозапилення створених ліній, стерильно пророщували на світлі в умовах термальності кімнати на безгормональному середовищі MS [15] спочатку без додавання фосфінотрицину (PPT). Верхівки 5–7-добових проростків із повністю сформованими несправжніми листочками відокремлювали і переносили на середовище з PPT (10 мг/л) і визначали розщеплення за цією ознакою за тиждень (нестійкі жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння).

Статистична обробка результатів проводилась за допомогою *t*-критерія Стьюдента згідно [16]. Експерименти виконували в трьох біологічних і п'яти аналітичних повторах.

Результати та обговорення

В результаті експериментів із вектором рСВ133, що несе синтетичний ген *epsps* і ген *bar*, отримано 11 незалежних фосфінотрицинстійких ліній ріпаку двох промислових ярих сортів, із них 7 ліній на основі сорту Ексголд і 4 лінії на основі сорту Титан. Регенеранти відбирались на середовищах із фосфінотрицином (рис. 3), тому що спроби провести селекцію на гліфосаті у нас виявились невдалими,

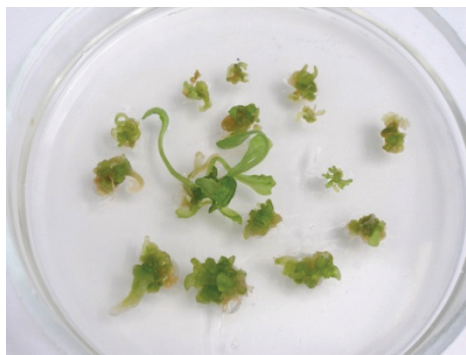


Рис. 3. Регенерація пагонів ріпаку на селективному середовищі з фосфінотрицином (5 мг/л PPT)

хоча в деяких публікаціях повідомлялось про використання фосфометилгліцину як селективного агента при відборі первинних трансформантів ріпаку в асептичних умовах [17]. Чутливість тканин рослин різних видів до PPT варіює. Селекцію рослин батату (*Ipomoea batatas*) [18] і чорниць Legacy (73,4 % *Vaccinium corymbosum* L. і 25 % *V.darrowi* Camp) [19] проводили за концентрації PPT 0,5 мг/л, для винограду *Vitis vinifera* використовували 2,5 мг/л PPT [20], для *Lotus japonicus* – 15 мг/л [21]. У наших експериментах селективна концентрація PPT у процесі регенерації дорівнювала 5 мг/л, при тестуванні проростків – 10 мг/л, регеновані рослини стабільно росли в асептичних умовах без ознак пригнічення при 20 мг/л PPT.

Інтеграцію трансгенів в рослинний геном показано за допомогою ПЛР (рис. 4, а, б).

ПЛР аналіз зворотних транскриптів (рис. 4, в) підтвердив експресію гена *epsps* на рівні транскрипції. Синтез матричної РНК гена *epsps* не відбувався в зразках, взятих з регенованих після трансформації з використанням вектора рСВ133 рослин, без додавання зворотної транскриптази (негативний контроль), тоді як при її додаванні спостерігали синтез фрагментів розміром 498 п.н. (рис. 4, в).

Лінії ріпаку, відібрані за допомогою молекулярно-біологічних аналізів серед регенованих на середовищах з PPT – 15/133/2, 15/133/3, 15/133/4, 15/133/5, 15/133/9, створені на основі сорту Ексколд, та 17/133/1, 17/133/4, 17/133/5, створені на основі сорту Титан, були розмножені *in vitro* живцюванням для подальшої висадки в закритий ґрунт. Висаджені в умовах теплиці в ґрунт рослини легко адаптувались. За три тижні після висадки в ґрунт було проведено обробку розчином гліфосату (2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»). В результаті обприскування сформоване раніше листя контрольних рослин зів'яло (рис. 5, а). Первинні трансформанти не мали ознак зневоднення після обробки гербіцидом, за винятком лінії 15/133/3, яка загинула після обприскування гліфосатом, що може свідчити про низьку експресію введеного гена *epsps*.

Обприскування рослин 20 % розчином Basta показало, що трансгенні рослини продовжували ріст, а контрольні вихідні рослини засихали (рис. 5, б).

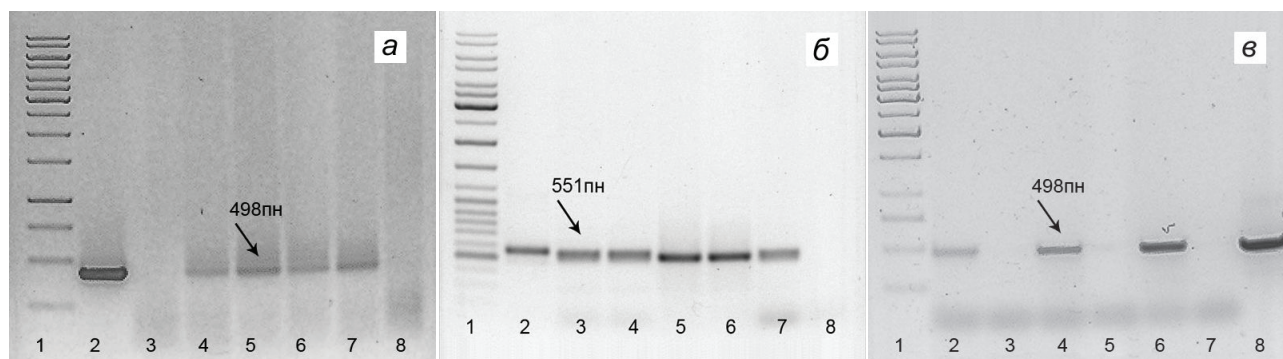


Рис. 4. Електрофореграми продуктів ампліфікації праймерів, специфічних до генів *epsps* (а) і *bar* (б) у ядерній ДНК трансформованих рослин ріпаку сортів Ексколд і Титан, і зворотних транскриптів гена *epsps* (в) тих самих рослин: а – 1 – маркер молекулярної маси O'Gene-Ruler 100 bp DNA Ladder Plus; 2 – ДНК вектора рСВ133, 3 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини ріпаку, 4–7 – незалежні трансгенні лінії; б – 1 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 2 – ДНК вектора рСВ133, 3–7 – незалежні трансгенні лінії, 8 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини ріпаку; в – 1 – маркер молекулярної маси O'Gene-Ruler 100 bp DNA Ladder Plus; 2 – ДНК вектора рСВ133, позитивний контроль; 3, 5, 7 – продукти ампліфікації незалежних ліній трансгенних рослин ріпаку після синтезу першого ланцюга ДНК без додавання ревертази (негативний контроль); 2, 4, 6 – продукти ампліфікації незалежних ліній трансгенних рослин ріпаку після синтезу першого ланцюга ДНК з додаванням ревертази M-MuLV

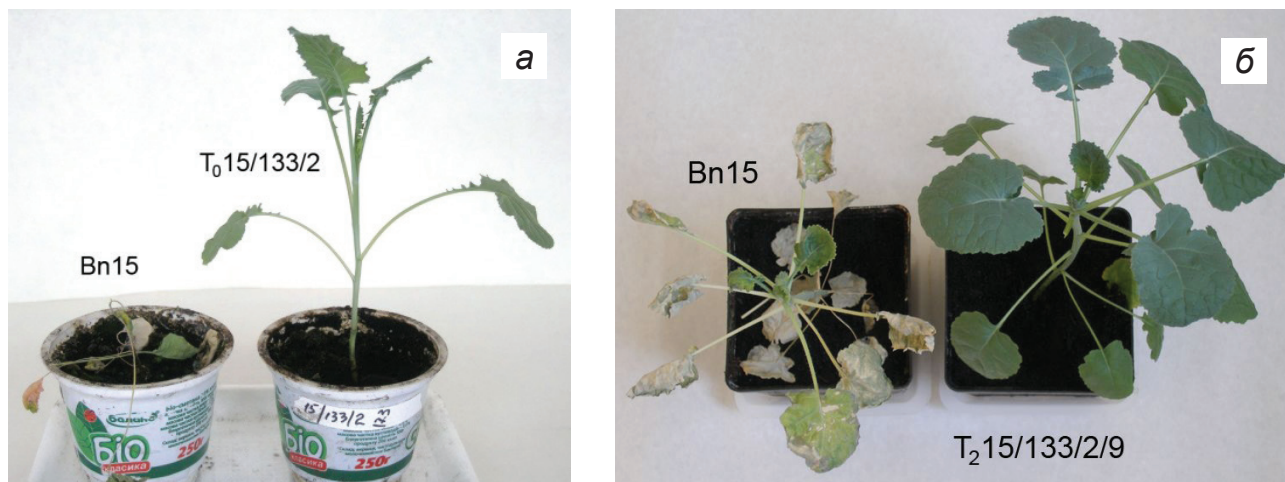


Рис. 5. Результати обприскування трансгенних рослин ріпаку з генами *epsps* і *bar* розчином гліфосату (а) і фосфінотрицину (б) в теплиці: Bn15 – вихідна рослина, сорт Екסголд; 15/133/2 – первинний трансформант, T215/133/2/9 – рослина другого покоління

Цвітіння біотехнологічних рослин ріпаку наставало у ті ж строки, що і у вихідних рослин. Із рослин, що витримали обробку гербіцидами, було отримано насіння в результаті самозапилення. Його стерильно пророщували на світлі спочатку на середовищах без додавання фосфінотрицину. Корені та гіпокотилі як тканини, що не мають хлорофілу, нечутливі до дії PPT, тому пророщування насіння на середовищі з PPT призводило до затягування тестування за рахунок розростання нечутливих тканин і виживання нетрансгенних проростків через акумуляцію селективного агента нечутливими тканинами. Верхівки 5–7-добових проростків із повністю сформованими несправжніми листочками відокремлювали і переносили на середовище з PPT (10 мг/л) і визначали розщеплення за цією ознакою за тиждень (нестійкі жовтіли і гинули, стійкі залишались зеленими і формували коріння).

У рослин ліній T_1 15/133/4 і T_1 17/133/4 розщеплення за ознакою стійкості до PPT не спостерігали, що говорить про вбудовування більш, ніж однієї копії трансгена (табл. 1). Для рослин лінії 15/133/2 виявлено розщеплення 3:1, що свідчить про однокопійну вставку чужорідного гена. Стійкі до фосфінотрицину проростки T_1 покоління лінії 15/133/2 було розмножено *in vitro* і висаджено в теплицю, загалом десять ліній. При аналізі отриманого при самозапиленні насіння у другому поколінні трансгенних рослин виявлено шість гомозиготних ліній за ознакою стійкості до фосфінотрицину (табл. 1).

Висадка в закритий ґрунт двох з цих ліній рослин (T_2 15/133/2/3 і T_2 15/133/2/9) та їх обробка гліфосатом показала, що вони зберігають ознаку стійкості до гербіциду.

У рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar*, а також у вихідних нетрансформованих рослин визначали біомасу і вміст СРБ під час росту в теплиці (табл.2) як показники, що характеризують стан рослин і можуть змінюватись під час стресів, якими є обробки гербіцидами. Біомасу надземної частини і СРБ у листках визначали перед обробкою гербіцидами та за три доби і за тиждень після обробок глюфозінатом і гліфосатом, відповідно.

Показано, що рослини з трансгенами *epsps* і *bar* у поколіннях T_0 – T_2 за умов теплиці, без обробок гербіцидами, не відрізняються від вихідних рослин за біомасою і вмістом СРБ (табл.2). Подібні результати отримано для рослин тютюну *Nicotiana tabacum* [22, 23] і картоплі *Solanum tuberosum* [22], які експресують тільки ген *bar*, і для рослин амаранту *Amaranthus palmeri* з різним рівнем експресії гена *epsps* [24]. Виявлено, що первинні трансформанти лінії T_0 15/133/3 не витримали обробки гліфосатом, ймовірно, через недостатню експресію трансгена *epsps*. Рослини інших трьох ліній первинних трансформантів були стійкими до дії обох гербіцидів і формували біомасу надземної частини, подібну до такої, яка була характерна для них без обробки. Лінії рослин у поколіннях T_0 – T_2 , які виявились стійкими до обробок гербіцидами, не

Таблиця 1. Генетичний аналіз рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar*

Лінія	Схожість насіння <i>in vitro</i> , %	Кількість рослин, шт.		Розщеплення	χ^2 *
		РРТ+	РРТ-		
T ₁ 15/133/2	99	73	26	3:1	0,08
T ₁ 15/133/4	94	94	–	відсутнє	–
T ₁ 15/133/5	97	74	23	3:1	0,05
T ₁ 15/133/9	98	72	26	3:1	0,11
T ₁ 17/133/1	92	68	24	3:1	0,01
T ₁ 17/133/4	100	100	–	відсутнє	–
T ₁ 17/133/5	95	70	25	3:1	0,08
T ₁ 17/133/7	97	68	29	3:1	0,91
T ₂ 15/133/2/1	98	98	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/2	100	100	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/3	98	70	28	3:1	0,61
T ₂ 15/133/2/4	99	99	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/5	97	68	29	3:1	1,11
T ₂ 15/133/2/6	97	71	26	3:1	0,08
T ₂ 15/133/2/7	98	98	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/8	97	68	29	3:1	1,11
T ₂ 15/133/2/9	100	100	–	відсутнє	–
T ₂ 15/133/2/10	98	98	–	відсутнє	–
Vn15 (контроль)	96	–	96	відсутнє	–
Vn17 (контроль)	99	–	99	відсутнє	–

Примітки. * – $\chi^2_{st} = 3,84$, Vn15 – сорт Ексолд, контроль; Vn17 – сорт Титан.

Таблиця 2. Біомаса і сумарний розчинний білок (СРБ) у листках рослин ріпаку вихідного сорту Ексолд і ліній з трансгенами *epsps* і *bar*, вирощених у теплиці

Назва лінії	Сира маса, г			СРБ, мг/г сирої маси		
	Без гербіцидів	РРТ	Гліфосат	Без гербіцидів	РРТ	Гліфосат
Vn15 (К)	20,52±1,2	0	0	24,2±1,5	н.в.	н.в.
T ₀ 15/133/2	21,48±1,3	20,49±1,2	19,86±1,4	24,05±1,3	23,96±1,3	23,82±1,4
T ₀ 15/133/3	20,45±1,1	20,56±1,4	н.в.	23,73±1,2	23,46±1,1	н.в.
T ₀ 15/133/4	19,48±1,4	19,49±1,4	19,24±1,4	23,96±1,2	23,87±1,7	23,78±1,1
T ₀ 15/133/5	20,48±1,4	20,34±1,2	20,14±1,2	24,02±1,1	23,78±1,3	23,9±1,4
T ₁ 15/133/2	20,59±1,3	20,46±1,5	20,27±1,5	24,15±1,1	23,64±1,2	23,96±1,4
T ₁ 15/133/4	19,51±1,4	19,44±1,5	19,34±1,3	23,7±1,4	23,76±1,1	23,61±1,1
T ₁ 15/133/5	20,49±1,2	20,24±1,1	19,48±1,4	23,85±1,1	23,7±1,5	23,65±1,4
T ₂ 15/133/2/3	20,51±1,4	20,35±1,5	19,48±1,5	23,83±1,1	23,54±1,2	23,46±1,2
T ₂ 15/133/2/9	20,46±1,2	19,46±1,6	19,24±1,4	23,92±1,2	24,02±1,1	23,88±1,3

Примітка. н.в. – не визначали через загибель рослин.

реагували на таку обробку як на стрес і зберігали свою здатність формувати біомасу і накопичувати сумарний розчинний білок після обробок гербіцидами на рівні контролю в умовах без обробок (табл.2).

Висновки

Таким чином, отримано біотехнологічні рослини ріпаку, які мають у ядерному геномі гени стійкості до гербіцидів на основі гліфосату (*epsp*) і глюфозінату (*bar*). Експресія трансгенів підтверджена у поколіннях T₁-T₂. Вона не впливає на накопичення біомаси і вміст СРБ у отриманих рослин в умовах закритого ґрунту.

Перелік літератури

1. Amrhein N., Deus B., Gehrke P., Steinrücken H.C.. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro* // Plant Physiol. – 1980. – Vol. 66, № 5. – P.830–834.
2. James C. ISAAA Briefs: preview, global status of commercialized transgenic crops / In ISAAA Briefs 30, ISAAA, Ithaca. – NY, 2003.
3. Pocket K. No. 10: herbicide tolerance technology: glyphosate and glufosinate // <https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/10/default.asp>
4. Lea P.J., Joy K.W., Ramos J.L., Guerrero M.G. The action of 2-amino-4-(methylphosphiny)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxoderivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants // Phytochem. – 1984. – Vol. 23, № 1. – P.1–6.
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. – Vol. 26, № 1. – P. 95–104.
6. Chhapekar S., Raghavendrarao S., Pavan G. et al. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate // Plant Cell Rep. – 2015. – Vol. 34, № 5. – P. 721–731.
7. 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. – Vol. 184. – P. 201–208.
8. Vencill W.K., Nichols R.L., Webster T.M., et al. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops // Weed Science. – 2012. – Special Issue. – P. 2–30.
9. <http://roundupreadycanola.com.au/wp-content/uploads/2014/03/What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola1.pdf>
10. Гочева Є.А., Сахно Л.О., Кучук М.В. Пат. 39205 UA 51 МПК A01H1/00; A01H4/00; A01H5/00; C12N1/00; C12N5/00; C12N15/00. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації. Заявл. 03.10.2008. Публ. 10.02.2009, бюл. № 3.
11. 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 Meths Applics. – 1993. – Vol. 3, № 1. – P. 69–70.
12. Logermann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Anal Biochem. – 1987. – Vol. 163. – P. 16–20.
13. 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. –Vol. 72. –P. 248–254.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
15. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш.школа, 1990. – 352 с.
16. Wang J.X., Zhao F.Y., Xu P. Use of *aroA-M1* as a selectable marker for *Brassica napus* transformation // Crop Sci. – 2006. – Vol. 46, № 2. – P.706–711.
17. Zang N., Zhai H., Gao S., et al. Efficient production of transgenic plants using the *bar* gene for herbicide resistance in sweetpotato // Scientia Horticulturæ. – 2009. – Vol. 122, № 4. – P. 649–653.
18. Song G.-Q., Sink K.C., Callow P.W. et al. Evaluation of a herbicide-resistant trait conferred by the *bar* gene driven by four distinct promoters in transgenic blueberry plants // JASHS. – 2008. – Vol. 133, № 4. – P. 605–611.
19. Jardak-Jamoussi R., Bouamama B., Mliki A., et al. The use of phosphinothricin resistance as selectable marker for genetic transformation of grapevine // Vitis. – 2008. – Vol. 47, № 1. – P. 35–37.
20. Lohar D.P., Schuller K., Buzas D. M. et al. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, № 361. – P. 1697–1702.
21. De Block M., Botterman J., Vandewiele M. et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J. – 1987. – Vol. 6, № 9. – P. 2513–2518.
22. 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_{scd} // Rus. J. Genet. – 2009. – Vol. 45, № 9. – P. 1067–1073.
23. Vila-Aiub M.M., Goh S.S., Gaines T.A. et al. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri* // Planta. – 2014. – Vol. 239, № 4. – P. 793–801.

Представлено О.В. Дубровною
Надійшла 05.04.2015

**УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЛИФОСАТУ И ГЛЮФОЗИНАТУ
В ПОКОЛЕНИЯХ T₁-T₂ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
РАСТЕНИЙ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)**

Л.А. Сахно, І.К. Комарницький, М.В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua

Цель. Получить биотехнологические растения рапса с трансгенами *epsps* и *bar*, которые введены в одном векторе, и изучить наследование чужеродных генов и устойчивость к соответствующим гербицидам в поколениях T₁-T₂. **Методы.** Генетическая трансформация с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, молекулярно-биологические (ПЦР, ОТ-ПЦР), генетический (выявление расщепления по признаку устойчивости к фосфинотрицину в асептических условиях), физиологический (изучение устойчивости к гербицидам, определение биомассы и суммарного растворимого белка (СРБ)). **Результаты.** Получены трансгенные растения рапса с генами устойчивости к гербицидам на основе глифосата (*epsps*) и глюфозината (*bar*). Показано введение чужеродных генов в ядерную ДНК и их активность на уровне транскрипции. Подтверждена устойчивость биотехнологических растений к действию гербицидов при обработке в теплице. Выявлено стабильное и сцепленное наследование введенных трансгенов. Показано, что трансгенные растения, выращенные в условиях закрытого грунта и не обработанные гербицидом, не отличаются от исходных нетрансформированных по биомассе и содержанию СРБ в листьях. Выявлено, что опрыскивание гербицидами не влияет на темпы роста биотехнологических растений, биомассу и СРБ. **Выводы.** Получены биотехнологические растения рапса, которые имеют в ядерном геноме гены устойчивости к гербицидам на основе глифосата (*epsps*) и глюфозината (*bar*). Экспрессия трансгенов подтверждена в поколениях T₁-T₂. Она не влияет на накопление биомассы и содержание СРБ у полученных растений в условиях закрытого грунта.

Ключевые слова: *Brassica napus* рапс, *epsps*, *bar*, глифосат, глюфозинат.

INHERITANCE OF GLYPHOSATE AND GLUFOSINATE RESISTANCE IN T₁-T₂ GENERATIONS OF BIOTECHNOLOGICAL CANOLA (*BRASSICA NAPUS* L.) PLANTS

L.O. Sakhno, I.K. Komarnitsskii, M.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua

Aim. To obtain the biotechnological canola plants using the introduction of *epsps* and *bar* genes in the same cassette and investigate both inheritance of target genes and resistance to corresponding herbicides in T₁-T₂ generations. **Methods.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation, molecular biological (PCR, RT-PCR), genetic (study of segregation for phosphinotricin resistance under aseptic conditions), physiological (evaluation of herbicide resistance, determination of biomass and total soluble proteins (TSP)). **Results.** The transgenic plants with *epsps* and *bar* genes of resistance to herbicides based on glyphosate and glufosinate have been obtained. The integration of target genes into nuclear genome and their activities on transcriptional level were shown. Resistance of biotechnological plants to herbicide treatments was proved in greenhouse. Stable and linked inheritance of transgenes was demonstrated. It was shown that transgenic plants grown in greenhouse and not treated with herbicide do not differ from the initial untransformed ones in biomass and TSP content in leaves, when they were. It was found that spraying of biotechnological plants with herbicides does not affect the growth rate, biomass, and TSP content. **Conclusions.** The biotechnological plants with genes of herbicide resistance to glyphosate (*epsps* gene) and glufosinate (*bar* gene) were obtained. Transgene expression was confirmed for T₁-T₂ generations. It did not influence biomass production and TSP content in transgenic plants under greenhouse conditions.

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