

НІТОВСЬКА І.О., КОМАРНИЦЬКИЙ І.К., МОРГУН Б.В.✉

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: iraniti@ukr.net, molgen@icbge.org.ua  
✉ molgen@icbge.org.ua

## СЕЛЕКЦІЯ НА ГЛІФОСАТІ ТРАНСГЕННИХ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ГЕНОТИПІВ, РАЙОНОВАНИХ В УКРАЇНІ

Отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів, є одним із найпоширеніших напрямків створення біотехнологічних рослин для сільського господарства [1, 2]. Найчастіше вводять гени, які забезпечують стійкість рослин до гліфосату, імідазолінонів, біалофосу. Гліфосат (N-фосфометилглїцин) є гербіцидом системної дії, найпоширенішим у світі. Він інгібує фермент метаболічного шляху шикимової кислоти 5-енолпірувилшкімат-3-фосфат синтазу (EPSPS), блокуючи біосинтез бензоїдних ароматичних сполук, у тому числі незамінних амінокислот (фенілаланіну, триптофану, треоніну), внаслідок чого рослина гине [3]. Фермент працює у хлоропластах рослин та кодується ядерним геном. Слід зауважити, що у тварин, як і в людини, синтез бензоїдних ароматичних сполук відбувається іншим шляхом і не інгібується гліфосатом. Одним із напрямків створення рослин, стійких до гліфосату, є введення мутантного гена *epsps*, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосату [4–6]. Ген *CP4epsps* є одним із таких генів, який було виділено з агробактерії штаму CP4 [7]. У трансгенній рослині він забезпечує стійкість до дії гербіциду, повністю компенсуючи функцію нативного рослинного ферменту EPSPS. У зв'язку з тим, що під час трансформації трапляються випадки вбудовування не цілого вектора, а його частини [8], або через можливу низьку експресію цільового гена в трансгенних рослинах, які відбирали завдяки експресії іншого гена [9], для отримання трансгенних рослин, стійких до гліфосату, найкращим є використання цього гербіциду в якості селективного агента. Повідомляють, що селекція на гліфосаті має ряд переваг для кукурудзи над іншими селективними маркерами загальногосподарського використання: по-перше, це низька частота отримання нетрансгенного матеріалу в результаті селекції, по-друге, вкрай низька ймовірність виникнення мутацій стійкості до гліфосату [5]. Проте в світі є небагато робіт, які описують використання гліфосату в якості селективного

агента [4, 5, 10], і не в усіх випадках така селекція була успішною [5, 9]. Також існує певна природна мінливість у рівні чутливості до гліфосату кукурудзи різних генотипів [11, 12]. У зв'язку з цим для отримання стійких до гліфосату рослин важливо дослідити умови селекції на гліфосаті для конкретних генотипів та експлантів.

Метою роботи було дослідити селективний вплив гліфосату на калюс кукурудзи конкретних генотипів та ефективність його використання для отримання трансгенного рослинного матеріалу. Ми працювали з генотипами кукурудзи, районованими в Україні. Генетичну трансформацію регенераційно активного калюсу кукурудзи здійснювали за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. У дослідженні використовували вектор, який містив ген *CP4epsps* стійкості до гербіциду гліфосату. В результаті проведеного дослідження була відпрацьована методика селекції трансгенного калюсу кукурудзи з використанням гліфосату в якості селективного агента.

### Матеріали і методи

Для трансформації в якості рослинного матеріалу використовували регенераційно активний калюс кукурудзи, отриманий із незрілих зародків урожаю 2015 року чотирьох генотипів (інбредної лінії PLS61, гібридів F<sub>1</sub> ДК267ЧПЛ61 і PLS61ЧДК267, а також соматонального варіанта гібридної лінії PLS61ЧДК304 – Rcult(PLS61ЧДК304), який був отриманий через регенерацію *in vitro*). Незрілі зародки були надані Державною установою Інститут сільського господарства степової зони НААН України (м. Дніпро). Калюс отримували з незрілих зародків кукурудзи шляхом культивування в умовах *in vitro* на модифікованому середовищі N6 [13] при 27°C у темряві. Кожні три тижні шматочки калюсу пересаджували на свіже поживне середовище.

Для генетичної трансформації кукурудзи використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101, яка містила плазмиду pCB135. До складу вектора входили гени *CP4epsps* під контролем промотору 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та *nptII* під контролем промотору нопаїнсинтази (рис. 1). Генетична конструкція pCB135 була сконструйована на основі вектора pICBV16 з колекції ІКБГІ НАН України шляхом ексцизії гена *gus* за допомогою рестриктаз *XhoI*

та *XbaI* і лігування гена *CP4epsps* під контроль 35S промотору. До 5'-кінця гена *CP4epsps* була приєднана послідовність, що кодує хлоропластний транзитний білок (СТР), який забезпечує доставку білка CP4EPSPS у хлоропласти. Селекцію агробактерії, трансформованої вектором pCB135, проводили, додаючи у поживні середовища антибіотики: 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину та 100 мг/л карбеніциліну.

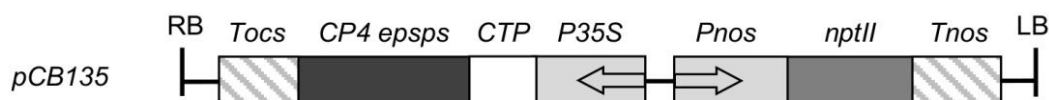


Рис. 1. Схема вектора pCB135: RB, LB – межі Т-ДНК; Tocs – термінатор гена октопінсинтази; *CP4epsps* – ген 5-еноїлпірувіл-шикімат-3-фосфатсинтази; СТР – хлоропластний транзитний пептид; P35S – промотор гена 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти; Pnos – промотор гена нопаїнсинтази; *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази; Tnos – термінатор гена нопаїнсинтази.

Нарощування культури *Agrobacterium tumefaciens* для трансформації та *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію морфогенного калюсу кукурудзи виконували за методикою [10]. Після трансформації калюси переносили на живильне середовище для калюсогенезу [13], яке містило 0,1 мМ гліфосату, та культивували у темряві при 27°C. За два тижні калюси садили на свіже середовище, у якому концентрація гліфосату була збільшена до 0,25 мМ, та вирощували за тих самих умов. Відібрані стійкі до гербіциду калюси пересажували на селективне регенераційне середовище [13], яке містило 0,1 мМ гліфосату, і вирощували в умовах освітлення при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді.

Сумарну ДНК з рослинного матеріалу виділяли за методикою з використанням ЦТАБ та ПВП-40 [14].

Виявлення генів *CP4epsps*, *nptII* в рослинній ДНК проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для унеможливлення забруднення рослинного матеріалу агробактерією перед аналізом на трансгени була проведена ампліфікація на присутність агробактеріального гена *vir-D1* [15]. Для ПЛР на ген *CP4epsps* була використана така пара праймерів: eps F: 5' - САА ТАС GGG САА GGC САТ GC - 3' і eps R: 5' - САТ ССГ ТСТ СГА ССГ ТАА GG -3', на ген *nptII* – пара праймерів, яка була описана раніше [16]. Розмір продуктів ампліфікації послідовності гена *vir-D1* мав складати 432 пар

нуклеотидів (п. н.), *CP4epsps* – 498 п. н., *nptII* – 700 п. н. Реакційна суміш для ПЛР (20 мкл) містила 0,5 одиниць FirePol ДНК-полімерази (Solis BioDyne), 2 мкл 10x буфера В, 1,6 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ кожного дНТФ, 0,1 мкМ кожного форвардного і реверсного праймера і 30 нг ДНК. У якості позитивного контролю для *nptII* використовували загальну ДНК трансформованої цим геном рослини тютюну, для *CP4epsps* – плазмиду pCB135, а для *vir-D1* – загальну ДНК агробактерії GV3101. Програма для ПЛР на ген *CP4epsps* була задана таким чином: перший цикл при 94°C протягом 4 хв з наступними 34 циклами (денатурація при 94°C 30 с, ренатурація при 59°C 30 с, елонгація при 72°C протягом 32 с). Програма ампліфікації для виявлення послідовності гена *nptII* була за методикою низхідної ПЛР: стартова денатурація – 4 хв. при 94°C; 9 циклів: 30 с при 94°C, 45 с при 68°C, 30 с при 72°C; 26 циклів: 30 с при 94°C, 30 с при 60°C, 30 с при 72°C. Кінцева елонгація склала 5 хв при 72 °C з наступним швидким охолодженням до 22°C. Ампліфікацію фрагмента гена *vir-D1* проводили за програмою [15]. ПЛР проводився з використанням ампліфікатора Eppendorf Mastercycler personal AG 22331 Germany. Продукти ампліфікації розділяли на 0,8 % агарозному гелі з бромистим егідієм (0,5 мкг/мл) у LB буфері [17] при 6 В/см протягом 90 хв.

### Результати та обговорення

Для отримання трансгенних рослин кукурудзи стійких до гліфосату, відпрацьовували методику селекції трансгенного матеріалу конкретних генотипів кукурудзи безпосередньо на гліфосаті. Було здійснено три експерименти з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенного калюсу чотирьох генотипів куку-

рудзи вектором pCB135 та опрацьовано в загальній кількості 160–200 калюсів для кожного генотипу (табл.). Селекцію трансгенного калюсу проводили на середовищах для калюсогенезу, які містили гліфосат у якості селективних агентів, опираючись на результати, викладені у дослідженні [10].

Таблиця. Селекція на середовищах із гліфосатом трансгенного калюсу кукурудзи після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135, який містить ген *CP4epsps*

Генотип	Загальна кількість опрацьованих калюсів, шт.	Калюси стійкі до гліфосату		Позеленіння калюсів на середовищі із гліфосатом		ПЛР аналіз на ген <i>CP4epsps</i>	
		шт	%	шт	%	кількість зразків, шт	«+»зразки, шт
PLS61	200	13	6,5	6	3	2	0
PLS61ЧДК267	164	41	25	0	0	0	0
ДК267ЧПЛС61	170	37	21,8	19	11,2	9	3
PLS61ЧДК304	165	39	23,6	7	4,2	4	0

Показано, що внесення гліфосату в середовища для калюсогенезу у концентрації 0,1 мМ для перших двох тижнів культивування та 0,25 мМ для наступних двох тижнів пригнічує проліферативну активність калюсу кукурудзи (рис. 2), що виявлялось у його потемнінні та відмиранні (рис. 2 А, В), порівняно з контрольними чашками без селективного агента (рис. 2 Б). Таким чином, незважаючи на те, що мішенню гліфосату є хлоропластний фермент 5-енолпіруватшикімат-3-фосфатсинтаза (EPSPS), і тому найбільшу негативну дію він виявляє в активно ростучих фотосинтезуючих рослинах, передусім у точках росту стебла і кореня [3], гліфосат також має селективний ефект на калюс в умовах темряви, що виявляється у зниженні його проліферативної активності до повного його потемніння і відмирання (рис. 2 А, В). Селективний вплив гліфосату на калюс, який наростає в умовах темряви, було виявлено також іншими дослідниками [10]. Чутливість калюсів до гліфосату різнилася залежно від генотипу кукурудзи. Найбільш пригнічувану дію гербіциду мав на калюс інбредної лінії PLS61, тоді як для гібридних генотипів цей вплив був менш токсичним. Те, що різні генотипи кукурудзи виявляють різний рівень чутливості до гліфоса-

ту, спостерігали також інші дослідники [11, 12]. Після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації більшість шматочків калюсів на селективному середовищі з гліфосатом виявилися чутливими до гербіциду, тоді як менша частина (від 6 до 25 %, залежно від генотипу, табл.) продовжували рости на селективному середовищі у темряві.

Через 6 тижнів культивування на середовищах для калюсогенезу з гліфосатом калюс, який активно наростає, переносили на регенераційне селективне середовище. Було виявлено, що за дослідних умов відбувалося пригнічення росту та позеленіння калюсу кукурудзи різних генотипів у контролі, який не піддавали *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. Після трансформації вектором pCB135 спостерігали позеленіння калюсу трьох генотипів кукурудзи, відібраного на селективних середовищах для калюсогенезу (табл.). Для гібридного генотипу PLS61ЧДК267 позеленіння калюсу на регенераційному середовищі із гліфосатом після трансформації не спостерігали (табл.). Найбільша кількість зелених калюсних ліній була отримана для гібридного генотипу ДК267ЧПЛС61 (табл.).

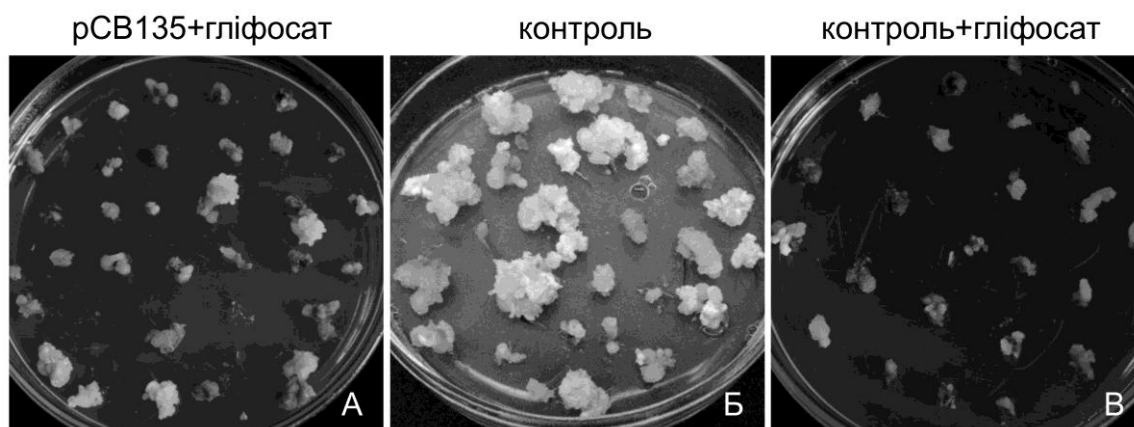


Рис. 2. Зовнішній вигляд калюсу кукурудзи інбредної лінії PLS61: А – на живильному середовищі для калюсогенезу, яке містить 0,25 мМ гліфосату після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135; Б – нетрансформований вихідний калюс (контроль) на середовищі для калюсогенезу без гербіциду; В – нетрансформований вихідний калюс на середовищі для калюсогенезу, яке містить 0,25 мМ гліфосату.

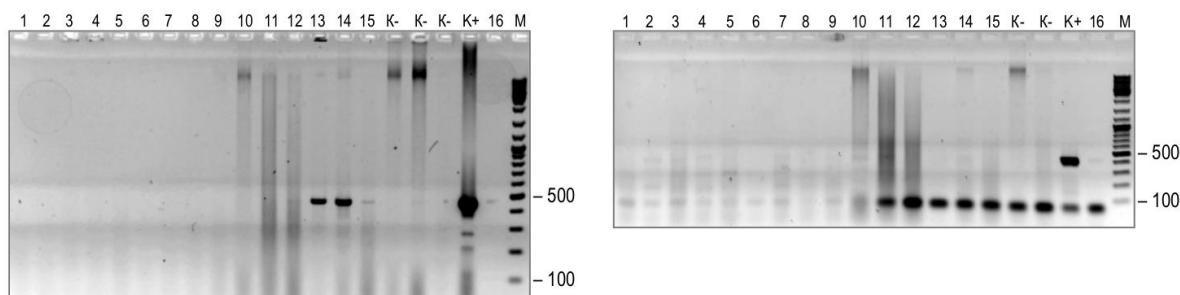


Рис. 3. Електрофореграма аналізу методом ПЛР рослинної ДНК калюсних ліній кукурудзи на присутність генів: *CP4epsps* (ліворуч) та *vir D1* (праворуч). Довжина очікуваного фрагмента для гена *CP4epsps* – 498 п. н. та *vir D1* – 432 п. н. К- – негативний контроль, нетрансформований калюс; К+ – позитивний контроль; М – маркер молекулярної маси ДНК. Доріжки 1-15 – калюсні лінії кукурудзи отримані після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135; 16 – контроль реакції без ДНК.

Через 4 тижні після перенесення калюсу на селективне регенераційне середовище спостерігали початок регенерації рослин зі стійкого до гліфосату калюсу кукурудзи для генотипів ДК267ЧPLS61 та PLS61ЧДК304.

Із 15 зелених калюсних ліній кукурудзи стійких до гліфосату, виділили загальну ДНК та дослідили присутність у ній гена *CP4epsps* методом ПЛР. У трьох калюсних лініях спостерігали ампліфікацію фрагмента очікуваного розміру 498 п. н. (рис. 3, табл.). Усі калюсні лінії кукурудзи, які мали ген *CP4epsps*, належали до гібридного генотипу ДК267ЧPLS61 (табл.). Частота трансформації за результатами аналізу ПЛР для цього генотипу кукурудзи в окремому експерименті складала 7,3 % та 1,8 %, якщо врахо-

увати кількість опрацьованих шматочків калюсу цього генотипу в трьох експериментах.

Методом ПЛР було показано наявність гена *nptII* в зразках, які містили ген *CP4epsps*, та відсутність бактеріальної ДНК в отриманих зразках загальної ДНК кукурудзи (рис. 3).

### Висновки

Відпрацьована методика селекції трансгенних ліній кукурудзи на гліфосаті після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації регенераційно активного калюсу. Показано, що для чотирьох генотипів кукурудзи, районуваних в Україні, використання у середовищах для калюсогенезу гліфосату в концентрації 0,1 мМ протягом перших двох тижнів та 0,25 мМ про-

тягом наступних двох викликає зниження проліферативної активності калюсу та його відмирання, а 0,1 мМ гліфосату у регенераційному середовищі негативно впливає на позеленіння калюсу. Чутливість калюсів до гліфосату різнилася залежно від генотипу кукурудзи. Використання гліфосату в якості селективного агента після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації виявилось ефективним для отримання трансгенних калюсних ліній кукурудзи, які містять ген *CP4epsps*. Регенераційно активний калюс тривалого культивування може виявитися

перспективним для отримання трансгенної кукурудзи. Успіх *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу кукурудзи залежав від генотипу вихідного матеріалу.

*Робота підтримана проектом 0115U004187 «Використання молекулярних та клітинних технологій для отримання біотехнологічних рослин пшениці та кукурудзи стійких до гербіциду гліфосату» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства».*

### Література

1. EU Register of Authorised GMOs [Електронний ресурс] // Regulation EC 1829/2003 – 2014. – Режим доступу: [http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).
2. USDA (2013) [Електронний ресурс]. Grain: world markets and trade. Circular series FG-05-13. – Режим доступу: <http://www.fas.usda.com/psonline/circulars/grain.pdf>.
3. Amrhein N., Deus B., Gehrke P., Steinbüchken 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. – V. 66, N. 5. – P. 830–834.
4. Zhou H., Arrowsmith J.W., Fromm M.E., Hironaka C.M., Taylor M.L., Rodriguez D., Pajean M.E., Brown S.M., Santino C.G., Fry J.E. Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation // *Plant Cell Rep.* – 1995. – V. 15. – P. 159–163.
5. Howe A.R., Gasser C.S., Brown S.M., Padgett S.R., Hart J., Parker G.B., Fromm M.E., Armstrong C.L. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants // *Mol. Breed.* – 2002. – V. 10. – P. 153–164.
6. Chhapekar S., Raghavendrarao S., Pavan G., Ramakrishna C., Singh V.K., Phanindra M.L., Dhandapani G., Sreevathsa R., Ananda Kumar P. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate // *Plant Cell Rep.* – 2015. – V. 34, N. 5. – P. 721–731.
7. Padgett S.R., Kolacz K.H., Delannay X., Re D.B., LaVallee B.J., Tinius C.N., Rhodes W.K., Otero Y.I., Barry G.F., Eichholtz D.A., Peschke V.M., Nida D.L., Taylor N.B., Kishore G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line // *Crop Sci.* – 1995. – V. 35. – P. 1451–1461.
8. Shrawat A.K., Lurz H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers // *Plant Biotechnology J.* – 2006. – V. 4, N. 6. – P. 575–603.
9. Сахно Л.О., Комарницький І.К., Кучук М.В. Стійкість до гліфосату і глюфофінату в поколіннях T<sub>1</sub>–T<sub>2</sub> біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 3–10.
10. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus // *Methods in molecular biology: transgenic maize*. M. Paul Scott (ed.). – USA: Humana press, 2009. – P. 47–58.
11. Forlani G., Racchi M.L. Glyphosate tolerance in maize (*Zea mays* L.). Differential response among inbred lines // *Euphytica.* – 1995. – V. 82. – P. 157–164.
12. Frascaroli E., Landi P., Sari Gorla M., Ottaviano E. Variability of pollen and plant responses to glyphosate in maize // *J. Genet. Breed.* – 1992. – V. 46. – P. 49–56.
13. Нітовська І.О., Дуплій В.П., Рудас В.А, Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Моргун Б.В. Оптимізація умов трансформації калюсних ліній кукурудзи за допомогою детекції транзиторної експресії гена бета-глюкуронідази // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць IX з'їзду УТГіС. – К.: Логос, 2012. – Т. 4. – С. 587–592.
14. Stewart N.C.Jr., Laura E. Via a rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR application // *BioTechnique.* – 1993. – V. 14, N. 5. – P. 748–749.
15. Lipp Joao K.H., Brown T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 *Rifr::pGSFR1161* in the presence of acetosyringone // *Plant Cell Rep.* – 1993. – V. 12. – P. 422–425.
16. Cannell M.E., Doherty A., Lazzeri P.A., Barcelo P. A population of wheat and tritordeum transformants showing a high degree of marker gene stability and heritability // *Theor and Appl Genet.* – 1999. – V. 99. – P. 772–784.
17. Brody J.R., Kern S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 333. – p. 1–13.

**NITOVSKA I.O., KOMARNYTSKY I.K., MORGUN B.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua*

**GLYPHOSATE SELECTION OF MAIZE TRANSGENIC CALLUS LINES AMONG GENOTYPES OF UKRAINIAN PLANT BREEDING**

**Aim.** Glyphosate selection has a number of advantages over other commonly used selectable markers for maize. There is some natural variability within maize germplasm for degree of sensitivity to glyphosate. We investigated the selective effect of glyphosate for production transgenic maize callus after *Agrobacterium*-mediated transformation among genotypes of Ukrainian plant breeding. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation, glyphosate selection *in vitro*, and PCR analysis were used to obtain transgenic maize callus and to confirm its status. **Results.** An efficient selectable marker system for production transgenic maize callus lines tolerant to herbicide glyphosate was proposed. Calluses of four maize genotypes of Ukrainian plant breeding and pCB135 vector containing *CP4epsps* gene were used in *Agrobacterium*-mediated transformation experiments. Three callus maize lines of DK267ЧPLS61 genotype containing *CP4epsps* gene were obtained. **Conclusions.** The use of glyphosate as a selective agent after *Agrobacterium*-mediated transformation proved to be effective for transgenic maize callus lines production containing the gene *CP4epsps*. The success of *Agrobacterium*-mediated transformation of maize callus strongly depended on the genotype of source material.

**Keywords:** *Agrobacterium*-mediated maize transformation, *CP4epsps* gene, glyphosate selection, PCR analysis.