

С.Н. НИФАНТОВА, Ю.В. СИМОНЕНКО,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины,
03143 Киев, ул. Заболотного, 148

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.), УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДУ PURSUIT



Трансгенные растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.), которые содержат мутантный ген *ahas/als*, обуславливающий устойчивость к гербициду Pursuit, были получены путем трансформации с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Трансформацию проводили тремя векторными конструкциями, несущими ген *ahas/als* под контролем различных промоторов. Селектирован ряд устойчивых к гербициду Pursuit и канамицину линий. Интеграция генов, перенесенных в растительный геном, доказана при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

© С.Н. НИФАНТОВА, Ю.В. СИМОНЕНКО,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК, 2005

Введение. Гербицид Pursuit относится к классу имидазолинонов. Механизм действия этих веществ заключается в ингибировании фермента ацетолактатсинтазы, что приводит к блокированию биосинтеза группы аминокислот с разветвленной углеводородной цепью валина, лейцина, изолейцина. Устойчивость растений к этому гербициду определяется мутацией в гене ацетолактатсинтазы *ahas/als*, в результате которой происходит замена пролина на серин в белковой цепи в 197-м положении [1], что приводит к снижению чувствительности фермента-мишени к гербициду. Растения, устойчивые к имидазолинонам, были получены как путем мутагенеза [2, 3], так и путем переноса гена мутантной ацетолактатсинтазы в растения [4–6].

Горох посевной является важной зернобобовой культурой, поэтому необходимо и целесообразно проведение работ по повышению его продуктивности и улучшению пищевой ценности. Развитие биотехнологии позволило разработать методы получения культурных видов, устойчивых к различным гербицидам. На данный момент получены трансгенные растения таких важных сельскохозяйственных видов, как табак, картофель, томаты, люцерна, устойчивые к фосфинотрицину [7–9]; соя, табак, томаты, устойчивые к глифосату [10–12]; табак, рис, устойчивые к гербицидам сульфонилмочевинной группы [4, 5, 13, 14]. В литературе известны несколько работ по трансформации гороха. В 1989–1991 гг. группа шведских исследователей получила трансгенные растения гороха посевного, устойчивые к канамицинсульфату и гигромицину [15, 16]. В 1993 г. австралийскими исследователями были получены трансгенные растения гороха, устойчивые к фосфинотрицину и канамицинсульфату [17]. В 1994 г. группой калифорнийских и австралийских исследователей были получены трансгенные растения гороха, содержащие обуславливающий устойчивость к насекомым ген ингибитора амилазы из бобов *aai-pv* [18]. В 1995 г. немецкими учеными были получены трансгенные колонии протопластов гороха с *gus* геном [19], в 1995 г. — трансгенные растения гороха, содержащие *ds*-элемент системы контролируемых элементов *as/ds* кукурузы [20, 21]. В 1999–2000 гг. в нашей лаборатории разработана система двойной трансформации гороха посевного и получены трансгенные растения, устойчивые к гербициду фосфинотрицину [22, 23].

Целью данной работы было получение трансгенных растений гороха посевного, содержащих мутантный ген *ahas/als*, который кодирует измененный фермент ацетолактатсинтазу и тем самым вызывает устойчивость к гербициду Pursuit, относящемуся к классу имидазолинонов. В настоящей статье мы сообщаем о введении и интеграции мутантного *ahas/als* гена в растения гороха посевного (*P. sativum* L.) сортов отечественной и зарубежной селекции.

Материал и методика. *Растительный материал.* В работе использовали асептически выращиваемые растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) на среде Гамборга В5 [24] четырех сортовых линий гороха голландской селекции (912097, 912354, 911181, 911016) и десяти сортовых линий гороха украинской селекции (Харьковский 85, Харьковский янтарный, Усатый 90, Резонатор, Орлус, Спрут-2, Адигумский, Адигумский-1, Альфа, Селена), а также ранее полученную нами линию 912097-2206 с повышенной регенерационной способностью [22].

Генетическая трансформация и селекция. Перенос генов осуществлялся с помощью агробактериальной трансформации методом «листных дисков» [25] с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Плазмиды, несущие мутантный ген *ahas/als*, были любезно предоставлены компанией «Cyamamid». В плазмидах рСВ004 и рСВ006 ген *ahas/als* находится под собственным промотором; конструкция рСВ004 также содержит дополнительный селективный маркерный ген *nptII*, обуславливающий устойчивость к канамицину. В плазмиде рСВ007 ген *ahas/als* находится под 35S-промотором вируса мозаики цветной капусты. Трансформацию производили по следующей схеме: растительные экспланты (листья и стебли, лишенные пазушных почек) кокультивировали с 2 мл ночной культуры *Agrobacterium tumefaciens* в 40 мл жидкой питательной среды EB5, которая представляет собой модификацию среды Гамборга В5 [24]. В нее дополнительно были добавлены регуляторы роста — 2,4-Д в концентрации 1 мкг/л, аденин в концентрации 0,5 мкг/л, БАП в концентрации 0,2 мкг/л. Материал инкубировали на шейкере в течение 2 сут при 130 об/мин в темноте при 22 °С. Через 48 ч отмытые и слегка подсушенные на фильтровальной бумаге экспланты переносили на агаризованную среду EB5 с цефатоксимом в

концентрации 400 мг/л для подавления роста агробактерии. Через 2 нед образовавшийся каллус переносили на селективные среды EB5, содержащие гербицид Pursuit в концентрации 20 мкг/л для конструкций рСВ006, рСВ007, а для конструкции рСВ004 и канамицин в концентрации 50 мг/л. Через 5—6 нед отобранные на селективных средах каллусы переносили на регенерационную среду с БАП в концентрации 1 мкг/л и $Ag_2S_2O_3$ с теми же селективными агентами. Тиосульфат серебра обладает антиэтиленовой активностью и тем самым повышает регенерационную способность каллусов, как было показано Блоком в 1988 г. [26].

Молекулярно-биологический анализ. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли ранее разработанные праймеры для амплификации последовательности 35S-промотора [27], f.5'-AGCCACTTCAGGTCCCGGAGC-3', г.5'-TCCAATCGCAGCAGGAAGTCC-3' для *ahas/als* гена и f.5'-CCTGAATGAAGTCCAGGACGAGGCA-3', г.5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3' для *nptII* гена. В реакции использовали 10 нг суммарной растительной ДНК, выделенной с помощью СТАБ-метода [28]. После 40 циклов амплификации образцы фракционировали в 2%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 100 В/см в течение 2 ч в ТВЕ-буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали с использованием красного фильтра.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе проведенной работы была определена селективная концентрация гербицида Pursuit для растений различных линий гороха посевного. Растения гороха высаживали на среду В5, содержащую различные концентрации гербицида. Результаты представлены в табл. 1. Растения всех анализируемых линий продолжали нормально развиваться на селективной среде, содержащей Pursuit в концентрации 2,5 мкг/л. При увеличении концентрации гербицида до 5 мкг/л растения линий отечественных сортов гороха оказались более чувствительными к действию Pursuit, чем растения линий голландской селекции, что выражалось в изменении морфологии стеблей и отмирании их нижних частей. При увеличении концентрации гербицида до 7,5 мкг/л отечественные сорта гороха прекращали рост и погибали в течение 3—4 нед, а в росте и развитии линий

Таблица 1

Влияние различных концентраций гербицида Pursuit на растения гороха посевного

Линия	Концентрация, мкг/л					
	2,5	5	7,5	10	15	20
911181	+++	++	+-	—	—	—
912097-2206	+++	++	+-	—	—	—
912097	+++	++	+-	—	—	—
912354	+++	++	+-	—	—	—
912016	+++	++	+-	—	—	—
Харьковский 85	+++	+-	—	—	—	—
Харьковский янтарный	+++	+-	—	—	—	—
Усатый 90	+++	+-	—	—	—	—
Резонатор	+++	+-	—	—	—	—
Орлус	+++	+-	—	—	—	—
Спрут-2	+++	+-	—	—	—	—
Адигумский	+++	+-	—	—	—	—
Альфа	+++	+-	—	—	—	—
Селена	+++	+-	—	—	—	—
Адигумский-1	+++	+-	—	—	—	—

Примечание. Селективную концентрацию определяли по способности растений расти на селективной среде: «+++» — все высаженные растения растут при данной концентрации; «+-» — растения с аномалиями роста и измененной морфологией; «—» — отсутствие роста и смерть высаженных растений.

Таблица 2

Количество регенерационных линий, отобранных на селективных средах

Линия	Растения		
	pCB004	pCB006	pCB007
911181	29	0	2
912097-2206	0	7	0
912097	0	3	31
912354	5	0	5
912016	0	0	5
Харьковский 85	1	0	0
Харьковский янтарный	1	0	0
Адигумский	0	0	3
Альфа	0	0	10
Селена	0	0	6
Адигумский-1	0	0	6

голландской селекции наблюдались изменения морфологии стеблей, а именно укорочение междоузлий и низкий прирост биомассы. При концентрации Pursuit 10 мкг/л и выше все высаженные растения погибали в течение 3–4 нед культивирования. Таким образом, нами была определена селективная концентрация гербицида Pursuit для различных линий гороха посевного, которая составила 10 мкг/л.

Аналогичную схему определения селективной концентрации гербицида использовали для определения чувствительности каллусных тканей гороха. Селективная концентрация Pursuit составила 20 мкг/л. Действие гербицида на каллусные ткани выражалось в полном подавлении прироста биомассы и в результате приводило к смерти тканей. Таким образом, чувствительность каллуса оказалась ниже, чем чувствительность целых растений, поэтому для отбора трансформированных каллусных линий использовали селективную концентрацию гербицида 20 мкг/л.

Трансформацию растений гороха производили тремя описанными генноинженерными конструкциями pCB004, pCB005, pCB006, содержащими гены *ahas/als* и *nptII*, используя методику кокультивации эксплантов с агробактерией. Образовавшийся первичный каллус переносили на селективную среду EB5, и отобранные зеленые каллусы в дальнейшем культивировали на среде для регенерации. Через 2,5–3 мес на отобранных каллусах начали появляться интенсивно-зеленые очаги регенерации, из которых впоследствии образовывались побеги (рис. 1). Результаты отбора представлены в табл. 2. Из-за низкой регенерационной способности для сортов Усатый 90, Резонатор, Орлус, Спрут-2 регенеранты по-

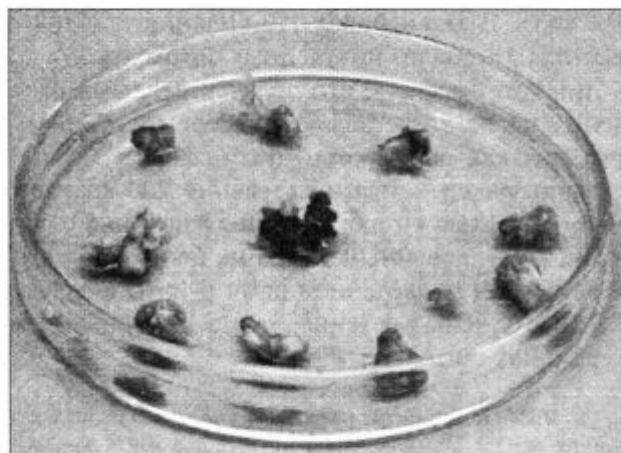


Рис. 1. Селекция и регенерация из трансформированных эксплантов на регенерационной среде Гамборга В5, содержащей 1 мкг/л БАП, 20 мкг/л Pursuit и 50 мг/л канамицина

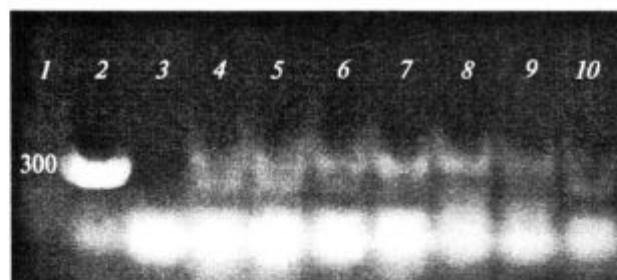


Рис. 2. ПЦР-анализ на наличие *ahas/als* гена в растительной ДНК трансформированных линий гороха: 1 — маркерная ДНК, 2 — ДНК плазмиды pCB004, 3 — ДНК контрольной нетрансформированной линии, 4–10 — ДНК трансформированных линий (4 — Харьковский 85 pCB004 R1, 5 — 912354 pCB004 R1, 6 — 912354 pCB004 R2, 7 — 911181 pCB004 R15, 8 — 911181 pCB004 R26, 9 — 911181 pCB004 R29, 10 — 911181 pCB004 R20)



Рис. 3. ПЦР-анализ на наличие *nptII* гена в растительной ДНК трансформированных линий гороха: 1 — маркерная ДНК, 2 — ДНК плазмиды pCB004, 3 — ДНК контрольной нетрансформированной линии, 4–10 — ДНК трансформированных линий (4 — Харьковский 85 pCB004 R1, 5 — 912354 pCB004 R1, 6 — 912354 pCB004 R2, 7 — 911181 pCB004 R15, 8 — 911181 pCB004 R26, 9 — 911181 pCB004 R29, 10 — 911181 pCB004 R20)

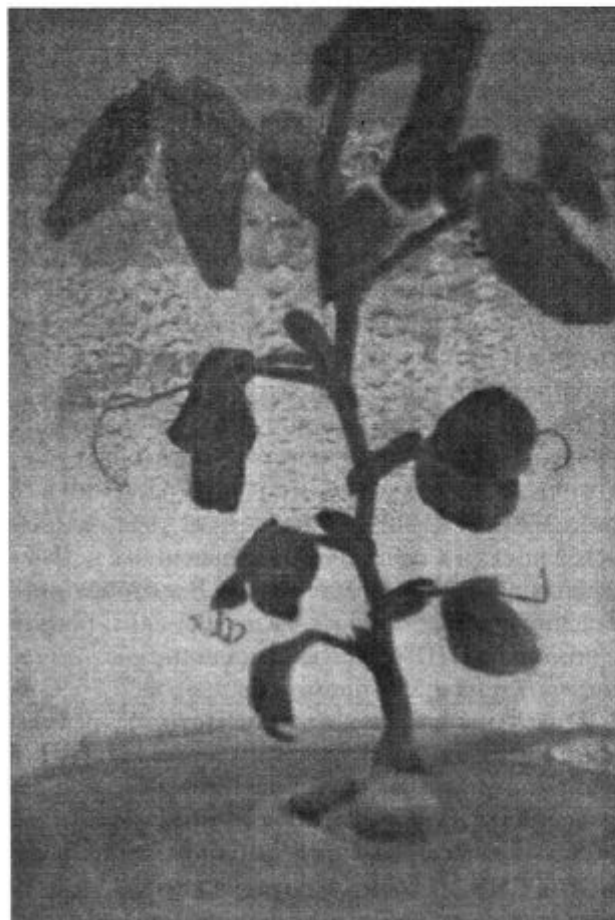


Рис. 4. Растения гороха первого поколения, растущие в культуре *in vitro* на среде В5, которая содержит Pursuit в концентрации 20 мкг/л

лучить не удалось. В контрольных опытах на селективных средах, содержащих канамицинсульфат и Pursuit, каллусогенез и морфогенез эксплантов, не обработанных агробактерией, не наблюдался.

В результате нами были отобраны 114 растений (36 pCB004-растений, 10 pCB006-растений и 68 pCB007-растений), у которых устойчивость к гербициду была выше как минимум в 4 раза по сравнению с нетрансформированными растениями. Далее нами были проведены опыты для определения уровня чувствительности отобранных растений к гербициду в более высоких концентрациях. Все растения высаживали на среду В5, содержащую Pursuit в концентрации 100 и 1000 мкг/л, что соответствует повышению уровня устойчивости в 20 и 200 раз. Через 3 нед культивирования растения, не обладающие доста-

точным уровнем устойчивости к гербициду при данных концентрациях, погибали.

В результате нами было отобрано 12 рСВ004-растений, устойчивых к Pursuit в концентрации 100 мкг/л, 10 из которых были также устойчивы к Pursuit в концентрации 1000 мкг/л; 10 рСВ006-растений, устойчивых к гербициду в концентрации 100 мкг/л, 6 из которых были также устойчивы к нему в концентрации 1000 мкг/л; 38 рСВ007-растений, устойчивых к Pursuit в концентрации 100 мкг/л, 27 из которых были также устойчивы к Pursuit в концентрации 1000 мкг/л.

Таким образом, мы получили 56 растений, уровень устойчивости которых превышает аналогичный показатель контрольных растений в 20 раз, и 39 растений с 200-кратным увеличением устойчивости к гербициду по сравнению с нетрансформированными растениями. Все отобранные предполагаемые трансформанты анализировали с помощью ПЦР-анализа на наличие *ahas/als* гена, *nptII* гена и 35S-промотора.

Получены следующие результаты: 12 регенерационных линий (7 растений линии 1911181, 4 растения линии 912354 и 1 растение линии Харьковский 85), трансформированных плазмидой рСВ004, дают в результате амплификации фрагменты ДНК требуемого размера как для *ahas/als* гена, так и для *nptII* гена (300 и 600 п.н. соответственно); 6 регенерационных линий (3 растения 912097 линии и 3 линии растения 912097-2206), трансформированных плазмидой рСВ006, дают в результате амплификации фрагменты ДНК требуемого размера для *ahas/als* гена (300 п.н.); 27 регенерационных линий (12 линии растений 912097, 2 растения линии 912354, 4 растения линии 912016, 2 растения линии Адигумский, 2 растения линии Альфа, 3 растения линии Селена и 2 растения линии Адигумский-1), трансформированных плазмидой рСВ007, дают в результате амплификации фрагменты ДНК требуемого размера как для *ahas/als* гена, так и для 35S-промотора (300 и 156 п.н. соответственно). Результаты для *ahas/als* гена представлены на рис. 2, а для *nptII* гена — на рис. 3. Для 35S-промотора результаты не показаны.

Путем культивирования на среде В5 с селективными агентами нами было получено 13 потомков трансгенных растений, которые также анализировались на наличие устойчивости к Pursuit (рис. 4). Для всех растений F₁ показана устойчивость к гербициду в концентрации 20 и

100 мкг/л. В дальнейшем нами планируется провести ПЦР-анализ полученных потомков.

Следует отметить, что полученные нами растения также представляют практический интерес, так как обладают ценными сельскохозяйственными свойствами, а именно 200-кратной устойчивостью к гербициду по сравнению с нетрансформированным горохом. Таким образом, в результате проведенной нами работы впервые были получены растения гороха, устойчивые к гербициду Pursuit.

SUMMARY. Transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants containing mutant *ahas/als* gene were obtained using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Transformation has been carried out using cocultivation of pea explants with *Agrobacterium tumefaciens* strain IBA4404 carrying genetic vectors рСВ004, рСВ006 and рСВ007 containing *ahas/als* and *nptII* genes. The presence of transferred genes in the genomes of transgenic plants has been confirmed by PCR analysis.

РЕЗЮМЕ. Трансгенні рослини гороху посівного (*Pisum sativum* L.), що містять мутантний ген *ahas/als*, одержували за допомогою методу генетичної трансформації з використанням штаму *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Трансформацію ліній гороху проводили з використанням трьох векторних конструкцій, які відрізнялися промоторами *ahas/als* гена. Були відібрані лінії, стійкі до гербициду Pursuit та канаміцинусульфату. Присутність перенесених генів у геномах одержаних рослин була доведена за допомогою ПЦР-аналізу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yadav N., McDevitt R.E., Benard S., Falco S.C. Single amino acid substitution in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — 83. — P. 4418—4422.
2. Погребняк Н.Я., Кравец О.А., Шиша Е.Н., Глеба Ю.Ю. Получение клеточных линий и растений картофеля, устойчивых к действию гербицида // Цитология и генетика. — 1992. — 26, № 2. — С. 50—55.
3. Haughn G.W., Smervijne C. Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* // Mol. Gen. Genet. — 1986. — 204. — P. 430—434.
4. Haughn G.W., Smitt J., Mazur B. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonyleurea herbicides // Mol. Gen. Genet. — 1988. — 211. — P. 266—271.
5. Lee K.Y., Townsend Y., Tepperman J. The molecular basis of sulfonyleurea herbicide resistance in tobacco // EMBO J. — 1988. — 7. — P. 1241—1248.
6. Smith J.K., Mauvais C.J., Knowlton S., Mazur B.J. Molecular biology of resistance to sulfonyleurea herbicides // Proc. Acad. Sci. Symp. Biotechnol. Crop Protect. — Washington, D.C., 1988. — P. 25—36.

7. De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N.R., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J. — 1987. — 6. — P. 2513—2518.
8. De Greef W., Delon R., De Block M. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions // Biotechnology. — 1989. — 7, № 6. — P. 61—64.
9. D'Halluin K., Botterman J., De Greef W. Engineering of herbicide-resistance alfalfa and evaluation under field conditions // Crop Sci. — 1990. — 30. — P. 866—871.
10. Clemente T.E., LaVallee B.J., Howe A.R., Conner-Ward D., Rozman R.J., Hunter P.E., Broyles D.L., Kasten D.S., Hinchee M.A. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation // Crop Sci. — 2000. — 40. — P. 797—803.
11. Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M. Expression in plants of mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate // Nature. — 1985. — 317. — P. 741—744.
12. Filatti J., Kisser J., Rose R., Comai L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector // Biotechnology. — 1987. — 5, № 5. — P. 726—730.
13. Hattori J., Rutledge R., Labbe H., Brown D., Sunohara G., Miki B. Multiple resistance to sulfonylureas and imidazolinones conferred by an acetohydroxyacid synthase gene with separate mutations for selective resistance // Mol. Gen. Genet. — 1992. — 232. — P. 167—173.
14. Li Z., Hayashimoto A., Murai N. A sulfonylurea herbicide resistance gene from *Arabidopsis thaliana* as a new selectable marker for production of fertile transgenic rice plants // Plant Physiol. — 1992. — 100. — P. 662—668.
15. Puonti-Kaerlas J., Eriksson T., Engstrom P. Inheritance of a bacterial hygromycin phosphotransferase gene in the progeny of primary transgenic plants // Theor. Appl. Genet. — 1992. — 84, № 3/4. — P. 443—450.
16. Puonti-Kaerlas J., Eriksson T., Engstrom P. Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer // Theor. Appl. Genet. — 1990. — 80, № 2. — P. 246—252.
17. Shroeder H., Schotz A., Wardley-Richardson T. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Physiol. — 1993. — 101, № 3. — P. 751—757.
18. Shade R., Shroeder H., Pueyo J. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles // Biotechnology. — 1994. — 12, № 8. — P. 793—796.
19. De Kathen A., Jacobsen H.-J. Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. // Transgenic Res. — 1995. — 4. — P. 184—191.
20. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Генетическая трансформация гороха конструкцией, содержащей Ds-элемент кукурузы, методом электропорации // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 49—54.
21. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Получение и молекулярно-биологический анализ трансгенных растений гороха (*Pisum sativum* L.), содержащих элемент кукурузы // Биополимеры и клетка. — 1995. — 11, № 3/4. — С. 82—87.
22. Симоненко Ю.В., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. «Двойная трансформация». Получение трансгенных фосфинотрициноустойчивых растений коммерческих линий гороха // Физиология растений. — 1999. — 46, № 6. — С. 915—918.
23. Симоненко Ю.В., Кучук Н.В. Генетическая трансформация гороха посевного методом электропорации протопластов // Физиология и биохимия культур растений. — 1999. — 31, № 3. — С. 203—207.
24. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. — 1968. — 50, № 1. — P. 151—158.
25. Horsch R.B., Fry J., Hoffman N. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. — 1985. — 227. — P. 1229—1231.
26. Block de M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl. Genet. — 1988. — 76. — P. 767—774.
27. Стороженко С.В. Анализ трансгенных растений с помощью полимеразной цепной реакции: пара универсальных праймеров для амплификации последовательности 35S-промотора // Биополимеры и клетка. — 1994. — 10, № 1. — С. 67—72.
28. Murray M.J., Thompson W.E. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. — 1980. — 8, № 19. — P. 4321—4325.

Поступила 03.12.04