

НІФАНТОВА С.М.<sup>✉</sup>, КОМАРНИЦЬКИЙ І.К., КУЧУК М.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: sveta@iicb.kiev.ua  
<sup>✉</sup>sveta@iicb.kiev.ua, (099) 301-55-30

## ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЛЮЦЕРНИ (*MEDICAGO SATIVA* L.) ТА АРАХІСУ (*ARACHIS HYPOGAEA* L.), СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ PURSUIT

Родина бобових займає важливе місце серед культурних видів у сільському господарстві. Важливість представників цієї родини полягає в тому, що вони є надійним джерелом порівняно не дорогого рослинного харчового білка. Люцерна (*Medicago sativa* L.) відноситься до пасовищних бобових і є важливою кормовою культурою. У світі з пасовищних бобових найбільше вирощується люцерна, і вона займає близько 2,5 % від загальної площі сільськогосподарських угідь. Арахіс (*Arachis hypogaea* L.) відноситься до зернобобових представників цієї родини. Крім того, ці культури використовуються також для виготовлення палива. Успіхи та перспективи розвитку трансформації родини бобових представлені в оглядах [1–4].

Широке застосування гербіцидів у сільському господарстві зумовлене, головним чином, їх селективним впливом на рослини, який призводить до загибелі бур'янів і не впливає на ріст і продуктивність сільськогосподарських культур. Pursuit відноситься до класу імідазолінів. Імідазоліни за механізмом дії відносяться до гербіцидів, що блокують вироблення рослинами незамінних для людини і тварин амінокислот валіну лейцину та ізолейцину. Ці гербіциди інгібують один із перших ферментів шляху біосинтезу цих амінокислот, блокуючи безпосередньо ацетолактатсинтазу. Стійкість рослин до дії цього гербіциду зумовлює мутація гена ацетолактатсинтази *ahas/als*, в результаті якої у білковому ланцюзі пролін замінюється на серин у 197 положенні [5]. Рослини, стійкі до імідазолінів, отримали як за допомогою мутагенезу [6], так і шляхом переносу мутантної ацетолак-

татсинтази в рослини [7–11]. У 2005 році нами були отримані трансгенні рослини гороху посівного (*Pisum sativum* L.), стійкі до Pursuit [12]. У 2011 році ми отримали трансгенні рослини квасолі звичайної, стійкі до цього ж гербіциду [13].

Метою цієї роботи було отримання трансгенних рослин люцерни (*Medicago sativa* L.) та арахісу (*Arachis hypogaea* L.), стійких до гербіциду Pursuit.

### Матеріали і методи

**Рослинний матеріал.** У роботі використовувалися асептично вирощені рослини люцерни (*Medicago sativa* L.) сортів «Віра», «Луна-2», «Полтавчанка» і «Популяція 134» вітчизняної селекції та рослини арахісу (*Arachis hypogaea* L.). **Бактеріальні штами.** Генетичну трансформацію проводили за допомогою штаму GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* з використанням плазміди pCB004 (рис. 1) як переносника мутантного *ahas/als* гена, що зумовлює стійкість до Pursuit, та маркерного *nptII* гена, що зумовлює стійкість до канаміцинсульфату.

**Генетична трансформація та селекція.**

Опосередковану трансформацію рослин арахісу та люцерни проводили з використанням *Agrobacterium tumefaciens*. В асептичних умовах гіпокотилі, сім'ядольні листки, стебла рослин нарізалися на експланти і переносилися на агаризоване середовище MSD, що містило регулятор росту dicamba у концентрації 1мкг/л для ініціації калюсогенезу. Через 5–7 днів усі експланти переносили у рідке поживне середовище того ж складу для кокультивації з нічною культурою *Agrobacterium tumefaciens*.

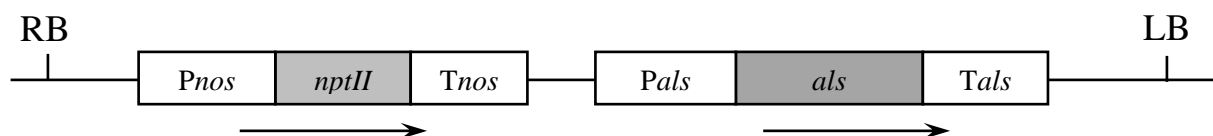


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарного вектора pCB004.

Кокультивацію проводили у темряві при температурі 22°C протягом 4 годин. Проводили інфільтрацію, експланти відмивали стерильною водою та переносили на агаризоване поживне середовище *MSD*, що містило 1000 мг/л цефатоксиму для елімінації агробактерії, та селективні агенти: 20–50 мкг/л Pursuit та 100 мг/л канаміцину. Через 2 тижні після селекції всі відібрані калюсні клони переносили на регенераційне середовище *MSR*, яке містило ВАР у концентрації 1 мкг/л,  $Ag_2S_2O_3$  [14] та ті ж самі селективні агенти. Молекулярно біологічний аналіз. Для підтвердження інтеграції перенесених генів у трансформовані рослини аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ-методом [15] за допомогою ПЛР із використанням праймерів 5'-AGCCACTTCAGGTCGCCGAGC-3' 5'-TCCAATCGCAGCAGGAAGTCC-3' для *ahas/als* гена та 5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCC GCTCAGAAG-3' для *nptII* гена. В реакції використовували 10 нг тотальної рослинної ДНК. Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл містила 1 мкг рослинної ДНК, праймери в концентрації 0,25мкМ, нуклеозидтрифосфати в конц. 0,5 мкМ, 0,5 од. ДНК полімерази Tag та буферний розчин. Ампліфікацію проводили за таких умов: 94°C 5 хв→(94°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 30 с)×30→72°C 5 хв. Після ампліфікації зразки фракціонували в 2 % агарозному гелі при напрузі електричного поля 100 В/см протягом 1 години у ТВЕ-буфері. Гелі забарвлювали бромистим етидієм і фотографували, використовуючи червоний фільтр.

### Результати та обговорення

У ході проведеної роботи була визначена селективна концентрація гербіциду Pursuit і канаміцину для калюсних тканин усіх введених

у культуру *in vitro* сортів люцерни та арахісу, яка склала 50 мкг/л Pursuit для люцерни і 30 мкг/л Pursuit для арахісу та 100 мг/л канаміцину для обох видів. Дія гербіциду на калюсні тканини виявлялася у повній відсутності приросту біомаси і в кінцевому результаті призводила до загибелі тканин. Результати для гербіциду Pursuit представлені в таблиці 1.

Селекцію проводили на агаризованому середовищі для калюсоутворення з додаванням дісамба у концентрації 1 мкг/л та Pursuit у концентрації 25–50 мкг/л і канаміцину у концентрації 100 мг/л. Після селекції всі відібрані калюсні клони переносили на регенераційне середовище з тими ж селективними агентами. Через 1–2 місяці на частині відібраних калюсів утворювалися інтенсивно-зелені осередки регенерації, з яких при подальшому культивуванні утворювалися пагони (рис. 2). Результати відбору регенераційних ліній представлені в таблиці 2.

У контрольних експериментах на селективних середовищах, які містили канаміцин і Pursuit, калусогенез і морфогенез експлантів, не оброблених агробактерією, не спостерігався.

Усі отримані регенераційні лінії аналізували за допомогою ПЛР-аналізу на наявність перенесених *ahas/als* та *nptII* генів. 3 регенераційні лінії люцерни сорту «Віра», 4 лінії люцерни сорту «Луна-2», 3 лінії люцерни сорту «Полтавчанка» та 4 лінії люцерну сорту «Популяція 134» дають у результаті ампліфікації фрагменти ДНК потрібного розміру як для *ahas/als* гена (рис. 3), так і для *nptII* гена (рис. 4): 300 п. о. і 622 п. о. відповідно. Отримані 32 стійкі регенераційні лінії арахісу до гербіциду Pursuit були проаналізовані методом ПЛР-аналізу на наявність перенесених генів, 17 ліній містили ген *ahas/als* та *nptII* гени.

Таблиця 1. Вплив різних концентрацій гербіциду Pursuit на калюсні тканини люцерни та арахісу.

Сорти	Pursuit 10мкг/л	Pursuit 20мкг/л	Pursuit 30мкг/л	Pursuit 40мкг/л	Pursuit 50мкг/л
Віра	+++	+++	+++	+-	-
Луна-2	+++	+++	+++	+-	-
Полтавчанка	+++	+++	+++	+-	-
Популяція 134	+++	+++	++	+-	-
Арахіс	+++	+-	-	-	-

Примітки: +++ всі калюсні тканини дають приріст біомаси при цій концентрації; +- зупинка приросту біомаси калюсних тканин; - загибель усіх калюсних тканин.

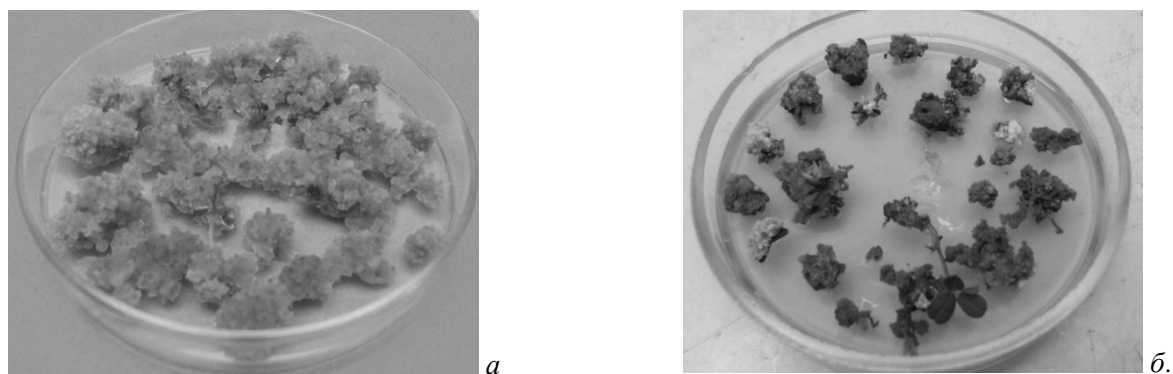
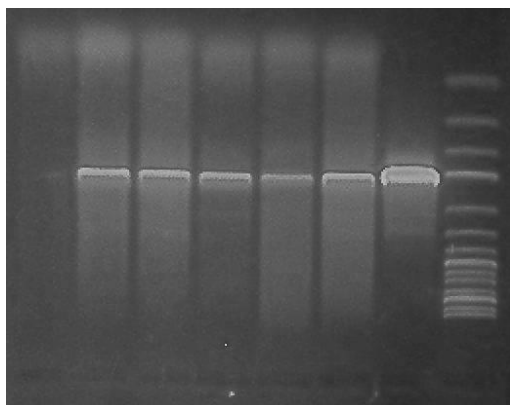


Рис. 2. Селекція та регенерація люцерни (а) та арахісу (б) на селективному середовищі з Pursuit у концентрації 50 мкг/л

Таблиця 2. Кількість регенераційних ліній люцерни та арахісу, відібраних на селективних середовищах із гербіцидом, та кількість рослин, трансгенна природа яких доведена за допомогою ПЛР-аналізу

Лінії	Кількість отриманих рослин, стійких до Pursuit	Кількість трансгенних рослин
Віра	23	3
Луна-2	19	4
Полтавчанка	15	3
Популяція 134	6	4
Арахіс	32	17



1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 3. Електрофореграма ПЛР-аналізу на наявність *ahas/als* гена в рослинній ДНК трансформованих ліній люцерни: 1 – ДНК контрольної лінії; 2–6 – ДНК трансформованих ліній (2 – ЛЗР3, 3 – Л1R4, 4 – Л1R7, 5 – Л1R8, 6 – Л2R2); 7 – ДНК плазмиди рСВ004; 8 – ДНК молекулярного маркера.

На сьогодні отримані трансгенні рослини люцерни, стійкі до фосотріцину [16]. Спільними зусиллями компаній Monsanto і Forage Genetics були отримані рослини люцерни з бактеріальним геном стійкості до гліфосату. Ген *EPSPS*, який надає стійкості, до гліфосату був перене-

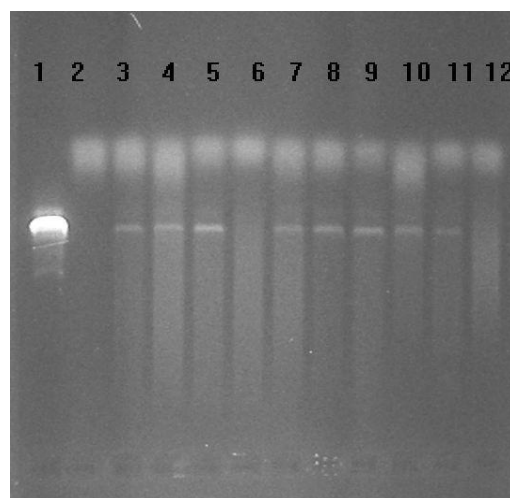


Рис. 4. Електрофореграма ПЛР-аналізу на наявність *nptII* гена в рослинній ДНК трансформованих ліній арахісу: 1 – ДНК плазмиди рСВ004(*nptII*); 2 – проба без ДНК; 3–11 – ДНК трансформованих ліній арахісу; 12 – ДНК контрольного арахісу.

сений у рослини люцерни за допомогою штаму *Agrobacterium CP4* [17].

У наших попередніх [12, 13] роботах ми отримали трансгенні рослини гороху посівного (*Pisum sativum* L.) та квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) з цінною сільськогосподар-

ською ознакою, а саме стійкістю до гербіциду нового покоління Pursuit.

### Висновки

У результаті проведеної нами роботи вперше були отримані трансгенні рослини люцерна

(*Medicago sativa* L.) та арахісу (*Arachis hypogaea* L.), які містять мутантний ген *ahas/als*, що зумовлює стійкість до гербіциду Pursuit, та доведена їх трансгенна природа.

### Література

1. Atkins C.A., Smith P.M.C. Genetic transformation and regeneration of legumes. In A. Legocki, H. Bothe, A. Puhler, eds, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. – Berlin: Springer-Verlag, 1997. – P. 283–304.
2. Babaoglu M., Davey M.R., Power J.B. Genetic engineering of grain legumes: key transformation events // AgBiotechNet. – 2000. – V. 2. – ABN 050. – P. 1–8.
3. Christou P. Biotechnology applied to grain legumes// Field Crop Res. – 2000. – V. 53. – P. 83–97.
4. Somers D.A., Samac D.A., Olhof P.M. Recent Advances in Legume Transformation // Plant Physiol. – 2003. – V. 131. – P. 892–899.
5. Yadav N., McDevitt, Benard R.E., Falco S.C. Single amino acid substitution in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1986. – V. 83. – P. 4418–4422.
6. Haughn G.W., Somerville C. Sulfonylurea-resistant *Arabidopsis thaliana* // Mol Gen Genet. – 1986. – V. 204. – P. 430–434.
7. Gabard J.M., Charest P.J., Charest, Iyer V.N., Miki B.L. Cross-Resistance to Short Residual Sulfonylurea Herbicides in Transgenic Tobacco Plants // Plant Physiol. – 1989. – V. 91. – P. 574–580.
8. Haugh G.W., Smitt J., Mazur B. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides // Mol. Gen. Genet. – 1988. – V. 211. – P. 266–271.
9. Lee K.Y., Townsend Y., Tepperman J. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco // EMBO J. – 1988. – V. 7. – P. 1241–1248.
10. Smith J.K., Mauvais C.J., Knowlton S., Mazur B.J. Molecular biology of resistance to sulfonylurea herbicides // Proc. ACS Symp. Biotechnol. Crop Protect. – Washington D.C., 1988. – P. 25–36.
11. 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. – Т. 26. – С. 50–55.
12. Ніфантова С.Н., Симоненко Ю.В., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Получение трансгенных растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.), устойчивых к гербициду Pursuit // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 16–21.
13. Nifantova S.N., Komarnickiy I.K., Kuchuk N.V. Obtaining of transgenic French bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) resistant to the herbicide Pursuit by *Agrobacterium*-mediated transformation // Цитология и генетика. – 2011. – № 2. – P. 97–100.
14. 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. – V. 6. – P. 2513–2518.
15. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – V. 12. – P. 13–15.
16. D'Halluin K., Botterman J., De Greef W. Engineering of herbicide-resistance alfalfa and evaluation under field conditions // Crop Sci. – 1990. – V. 30. – P. 866–871.
17. Heck G.R., Armstrong C.L., Astwood J.D., Behr C.F., Bookout J.T., Brown S.M., Cavato T.A., DeBoer D.L., Deng M.Y., George C., Hillyard J.R., Hironaka C.M., Howe A.R., Jakse E.H., Ledesma B.E., Lee T.C., Lirette R.P., Mangano M.L., Mutz J.N., Qi Y., Rodriguez R.E., Sidhu S.R., Silvanovich A., Stoecker M.A., Yingling R.A., You J. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event // Crop Sci. – 2005. – N 44. – P. 329–339.

### NIFANTOVA S.N., KOMARNICKIY I.K., KUCHUK N.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv-143, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: sveta@iicb.kiev.ua

### OBTAINING OF TRANSGENIC ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) AND PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) PLANTS RESISTANT TO THE HERBICIDE PURSUIT BY *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION

**Aim.** The production of alfalfa and peanut cultivars with new properties is necessary. The purpose of this work was to develop *Agrobacterium*-mediated transformation protocol and to construct transgenic alfalfa and peanut plants resistant to herbicide Pursuit **Methods.** Genetic transformation was carried out using cocultivation of peanut and alfalfa explants with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 carrying genetic construct pCB004 containing mutant *ahas/als* gene and *nptII* gene. Selection was held on the solidified callus inducing medium with 50 mg/l Pursuit. The selected callus clones were put on the regeneration medium with the same selective agents. Obtained regeneration lines were analysed using PCR-analysis. **Results.** 17 peanut and 14 alfalfa regeneration lines had positive signals after PCR analysis with DNA fragments of required molecular size for *ahas/als* and *nptII* genes. **Conclusions.** Transgenic alfalfa and peanut plants resistant to the herbicide Pursuit were obtained.

**Keywords:** alfalfa, peanut, *ahas/als* gene, transformation.