

ГНАТЮК І. С.<sup>1,2</sup>✉, ВАРЧЕНКО О. І.<sup>1,2</sup>, ПАРІЙ М. Ф.<sup>2</sup>, СИМОНЕНКО Ю. В.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148б, e-mail: ignatyuk94@gmail.com

<sup>2</sup> Всеукраїнський науковий інститут селекції,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

✉ ignatyuk94@gmail.com, (066) 693-93-58

## ПІДБІР СЕЛЕКТИВНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГЛІФОСАТУ ДЛЯ ЕФЕКТИВНОГО ВІДБОРУ *IN VITRO* ТРАНСГЕННИХ ТКАНИН ОЗИМОГО РІПАКУ *BRASSICA NAPUS L.*

**Мета.** За допомогою селекції *in vitro* гліфосат-резистентного та нестійкого озимого ріпаку підібрати оптимальну концентрацію гліфосату для ефективного відбору трансгенних тканин під час біотехнологічних досліджень ріпаку. **Методи.** Експлантами слугували 7–10 мм фрагменти гіпокотилів 6-денних проростків ріпаку, які культивували на середовищі МС, доповненому 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), протягом 12 діб за 24° С в умовах темряви для ініціації калусогенезу. Для регенерації рослин використовували живильне середовище МС, доповнене 3 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 2 мг/л зеатину, 0,1, 0,5 та 1 мМ гліфосату відповідно. У якості контролю використовували регенераційне живильне середовище без додавання гліфосату. Результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Excel. **Результати.** Встановлено, що на середовищі, доповненому 0,1 мМ гліфосату, експланти із нестійкого озимого ріпаку утворювали листки та пагони з частотою до 8,3 % ± 0,8 % порівняно з 57,2 % ± 0,6 % такої у контролі. Проте, під час культивування таких пагонів на середовищі для елонгації, що доповнене 0,1 мМ гліфосату, морфогенні структури не проходили селективний відбір. **Висновки.** Для проведення селекції ріпаку *in vitro* в живильному середовищі на етапі формування адвентивних бруньок можна використовувати концентрацію гліфосату 0,1 мМ. Але в середовищі для регенерації кількість гербіциду слід збільшувати для уникнення хибно-позитивних результатів.

**Ключові слова:** озимий ріпак, *Brassica napus L.*, культура *in vitro*, селективні маркери, гербіциди, гліфосат.

Ріпак – *Brassica napus L.* – належить до роду *Brassica*, родини капустяні *Brassicaceae*,

представлений ярою (*B. napus oleifera annua*) та озимою (*B. napus oleifera biennis*) формами. Сьогодні ріпак вирощується в багатьох країнах світу, в тому числі в більшості країн Західної Європи, особливо в тих регіонах, де природні умови не дозволяють вирощувати інші, більш продуктивні олійні культури. Насіння ріпаку містить від 38 % до 50 % олії, 16–29 % білка, 6–7 % клітковини, 24–26 % безазотистих екстрактивних речовин. Ріпакова олія широко використовується в харчовій, хімічній, текстильній та металургійній промисловостях. Олію з ріпаку використовують як заміник дизпалива для тракторів, автомобілів і в промислових силових установках.

Серед основних напрямків селекції ріпаку провідне місце займає отримання рослин, стійких до гербіцидів. Гліфосат є діючою речовиною широко використовуваних і важливих гербіцидів у світі, оскільки він ефективний, економічний і екологічно доброякісний. Генетично модифіковані (ГМ) культури, стійкі до гербіцидів широкого спектра дії гліфосату та глюфозинату, були вперше комерційно вирощені в 1990-х рр. [1], а ГМ-культури, що несуть стійкість до інших гербіцидів, перебувають у стадії розробки [2] або вже присутні на ринку (з різними ознаками стійкості до гербіцидів, поєднаними в одній культурі) [3].

Гліфосат пригнічує 5-еноїлпірувілшикімат-3-фосфат-синтазу (EPSPS), фермент шикиматного шляху біосинтезу ароматичних амінокислот і фенолів у рослинах та мікроорганізмах. Цей фермент відсутній у клітинах людини і тварин [4]. Глюфозинат амонію є еквімолярною, рацемічною сумішшю d- і l-ізомерів фосфотрицину (PPT). L-ізомер інгібує глютамінсинтазу рослин, що призводить до накопичення летальних рівнів аміаку [5]. Для забезпечення стійкості до гліфосату більшість гліфосат-стійких

культур експресують нечутливий до гліфосату EPSPS, отриманий з *Agrobacterium* spp., або ж гліфосат-деградуєчий фермент гліфосат оксидоредуктазу (GOX) та/або фермент гліфосат ацетилтрансферазу (GAT), що модифікує гліфосат. Хоча багато видів трансгенних культур, стійких до дії гербіцидів, було отримано та випробувано в польових умовах, з кінця 1990-х років комерційно широко вирощують лише чотири: сою, кукурудзу, бавовну та ріпак [6].

Відомо, що традиційні методи селекції для отримання нових форм рослин є трудомісткими, часо- та ресурсозатратними. Нетрадиційне генетичне поліпшення ріпаку базується на застосуванні культури тканин *in vitro* та молекулярно-генетичних підходах. Одним із методів отримання стійких рослин є *Agrobacterium*-опосередкована генетична трансформація, яка передбачає відбір трансгенних рослин на живильному середовищі, доповненому селективним агентом. Зазвичай, окрім цільового гена, бактеріальний вектор, яким модифікують рослинні клітини, містить маркерні або репортерні гени, що дозволяють детектувати та відбирати трансгенні тканини і органи (наприклад, гени GFP – green fluorescent protein, YFP – yellow fluorescent protein, GUS – ген  $\beta$ -глюкуронідази або ж гени стійкості до антибіотиків тощо). Однак для спрощення процедури створення генетичної конструкції та відбору модифікованих тканин можна використовували лише цільовий ген стійкості до гліфосату та селектувати трансгенні тканини безпосередньо на середовищі, доповненому цим селективним агентом.

З огляду на все вищесказане, метою нашого дослідження було підібрати оптимальну концентрацію гліфосату для ефективної селекції озимого ріпаку *in vitro*.

### Матеріали і методи

У якості рослинного матеріалу використовували насіння озимого ріпаку сортів вітчизняної селекції, люб'язно надане ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції», та насіння гліфосат-резистентного (RR) ріпаку Roundup Ready™ Canola GT73 (RT73), отриманого компанією «Monsanto Company». Рослини вводили в культуру *in vitro* шляхом поверхневої стерилізації насіння та пророщували на безгормональному живильному середовищі МС [7]. Експлантатами слугували 7–10 мм фрагменти гіпокотилів 6-денних проростків, які культивували на середовищі МС, доповненому 1 мг/л 2,4-Д протягом

12 діб за 24 °С в умовах темряви для ініціації калусогенезу. Індукцію органогенезу проводили на живильному середовищі МС, доповненому 4 мг/л БАП, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub> та 2 мг/л зеатину [8], а також додавали тестовані концентрації гліфосату – 0,1, 0,5 та 1 мМ. Культивування здійснювали в умовах культивативної кімнати за 24 °С та 16-год фотоперіоду. Для регенерації рослин використовували живильне середовище МС, доповнене 3 мг/л БАП, 2 мг/л зеатину, 0,1, 0,5 та 1 мМ гліфосату відповідно. Елонгацію утворених пагонів здійснювали на живильному середовищі МС з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л БАП та 0,1 мМ гліфосату. У якості контролю використовували регенераційне живильне середовище без додавання гліфосату. Всі живильні середовища, використані в дослідженні, були доповнені 400 мг/л антибіотика цефтріаксону.

Результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Excel.

### Результати та обговорення

За даними попередніх досліджень, для селекції *in vitro* стійкого насіння арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.) використовували такі концентрації гліфосату: 0,2, 0,5 та 1 мМ відповідно [9]; для відбору трансгенного калусу рису (*Oryza sativa* L.) – 2 мМ гліфосату [10]; для селекції стійкого калусу пшениці (*Triticum aestivum* L.) до живильного середовища для калусогенезу додавали 0,1 мМ гліфосату, а в регенераційному середовищі цю концентрацію зменшували до 0,02 мМ [11]; у випадку генетичної трансформації зародків кукурудзи (*Zea mays* L.) калусні тканини поміщали на живильне середовище, яке містило 1 мМ гліфосату, а через місяць культивування концентрацію збільшували до 3 мМ [12]. Грунтуючись на цих даних, для експериментального підбору оптимальної концентрації гліфосату з перспективою майбутньої ефективної селекції озимого ріпаку *in vitro* ми обрали такі концентрації гербіциду: 0,1, 0,5 та 1 мМ відповідно.

Нами було встановлено, що морфогенетичні показники RR ріпаку знаходилися на однаково високому рівні (до 100 %) за додавання всіх трьох тестованих концентрацій гліфосату. Частота гомогенезу, тобто утворення листків і пагонів із морфогенетичних осередків, була теж приблизно на одному рівні і становила від 17,9 %  $\pm$  2,4 % на середовищі, доповненому 1 мМ гліфосату, до 30,6 %  $\pm$  1,2 % на середови-

щі, де його кількість становила 0,1 мМ, порівняно з 33,3 % ± 1,5 % на контрольному середовищі (табл.).

Експланти із насіння нестійкого ріпаку утворювали морфогенетичні осередки на всіх концентраціях гліфосату, які перевірялися, але частота їх утворення знижувалася пропорційно збільшенню концентрації гербіциду (табл.). Так, за продовження тривалості культивування на регенераційному живильному середовищі МС, доповненому 0,5 та 1 мМ гліфосату, до 4-х тижнів експланти гинули повністю. Проте на середовищі, доповненому 0,1 мМ гліфосату, експла-

нти все ще утворювали листки та пагони з частотою до 8,3 % ± 0,8 % порівняно з 57,2 % ± 0,6 % такої у контролі. При цьому частота морфогенезу становила 55,6 % ± 0,5 % на регенераційному середовищі, доповненому 0,1 мМ гліфосату (порівняно з 93,3 % ± 2,1 % у контролі).

На рисунку зображено візуальну різницю в утворенні морфогенетичних осередків та регенерації листків і пагонів із експлантів гліфосат-резистентного (А) та нестійкого озимого ріпаку (Б) на середовищі, доповненому однаковою концентрацією гербіциду гліфосату.

Таблиця. Частота морфогенетичних показників (%) озимого ріпаку на регенераційному живильному середовищі МС, доповненому відповідними регуляторами росту

Ріпак, що тестується	Показники регенерації	Концентрація гліфосату, мМ			
		0,1	0,5	1	- (контроль)
Гліфосат-резистентний (RR <sup>®</sup> , Monsanto)	Морфогенез	99,2±0,8	98,8±0,8	99,5±0,5	100
	Ризогенез	80,4±1,9	50,6±2,4	26,1±2,1	94,5±1,5
	Гемогенез	30,6±1,2	28,5±2,2	17,9±2,4	33,3±1,5
Лінія озимого ріпаку Vn (ТОВ «ВНІС»)	Морфогенез	55,6±0,5	26,8±1,6	11,4±0,9	93,3±2,1
	Ризогенез	20,7±1,5	11,3±1,1	2,1±1,8	62,7±1,9
	Гемогенез	8,3±0,8	-	-	57,2±0,6

Примітка. \* Відмінності в порівнянні з контролем достовірні за P < 0,001.

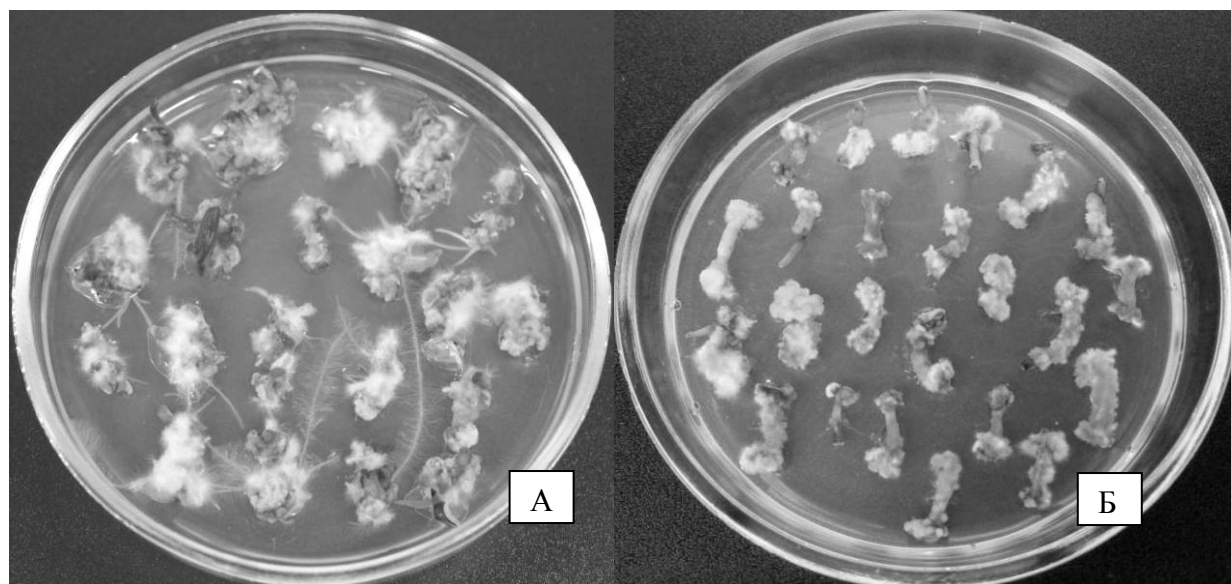


Рис. Експланти, отримані з гліфосат-резистентного (RR<sup>®</sup>, Monsanto) озимого ріпаку (А) та з лінії озимого ріпаку Vn (ТОВ «ВНІС») (Б) через місяць після культивування на агаризованому живильному середовищі МС, доповненому 4 мг/л БАП, 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 2 мг/л зеатину та 0,1 мМ гліфосату.

У подальшому утворені пагони висаджували на живильне середовище МС, яке містило половинний вміст макро- та мікросолей і було доповнене 0,1 мг/л БАП та 0,1 мМ гліфосату для елонгації, всі регенеранти RR ріпаку були успішно елонговані та висаджені на безгормональне середовище МС, доповнене 0,1 мМ гліфосату, для вкорінення. Проте, за висаджування на аналогічне живильне середовище пагонів, отриманих із експлантів лінії нестійкого озимого ріпаку Вп, нам не вдалося отримати життєздатних рослин-регенерантів, тобто всі хибно-позитивні результати можна селектувати на пізніших стадіях регенерації рослин.

### References

1. Nandula V.K. Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management. Wiley: Hoboken, 2010. 344 p.
2. Green J.M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag Sci.* 2014. Vol. 70, № 9. P. 1351–1357. doi: 10.1002/ps.3727.
3. USDA (2015) Determinations of non-regulated status. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/petitions\\_table\\_pending.shtml](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/petitions_table_pending.shtml). Accessed 21 Sept 2015.
4. OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology. Report No. 10. URL: <https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815618.pdf>. Accessed 24 Sept 2015 (Last accessed: 1.04.2019).
5. OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to Phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology. Report No. 11. URL: <https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf> (Last accessed: 1.04.2019).
6. Schütte G., Eckerstorfer M., Rastelli V., Reichenbecher W., Restrepo-Vassalli S., Ruohonen-Lehto M., Wuest Saucy A.-G., Mertens M. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environ Sci Eur.* 2017. Vol. 29, № 5. doi: 10.1186/s12302-016-0100-y.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
8. Rahnama H., Sheykhasan M. Transformation and light inducible expression of cry1Ab gene in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Sci. I. R. Iran.* 2016. Vol. 27, № 4. P. 313–319.
9. Xing X.-J., Tian Y.-S., Peng R.-H., Xu J., Zhao W., Yao Q.-H., Sun S. Functional characterization of 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Alkaliphilus metalliredigens* in transgenic Arabidopsis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 24, № 10. P. 1421–1426. URL: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1404.04023> (Last accessed: 1.04.2019).
10. Zhao Q., Liu M., Zhang X., Lin C., Zhang Q., Shen Z. Generation of insect-resistant and glyphosate-tolerant rice by introduction of a T-DNA containing two Bt insecticidal genes and an EPSPS gene. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol).* 2015. Vol. 16, № 10. P. 824–831. doi: 10.1631/jzus.B1500056.
11. Hu T., Metz S., Chay C., Zhou H. P., Biest N., Chen G., Cheng M., Feng X., Radionenko M., Lu F., Fry J. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 21. P. 1010–1019. doi: 10.1007/s00299-003-0617-6.
12. Howe A.R., Gasser C.S., Brown S.M., Padgett S.R., Hart J., Parker G.B., Eromm M.E., Armstrong C.L. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Molecular breeding.* 2002. Vol. 10. P. 153–164.

**HNATIUK I. S.<sup>1,2</sup>, VARCHENKO O. I.<sup>1,2</sup>, PARIJ M. F.<sup>2</sup>, SYMONENKO Yu. V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: ignatyuk94@gmail.com*

<sup>2</sup> *Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str., 30*

### ESTABLISHMENT OF GLYPHOSATE SELECTIVE CONCENTRATIONS FOR WINTER RAPESEED (*BRASSICA NAPUS* L.) TRANSGENIC TISSUES EFFICIENT SELECTION *IN VITRO*

**Aim.** To establish the optimal concentration of glyphosate for efficient selection of transgenic tissue culture in biotechnology of rapeseed by *in vitro* selection of glyphosate-resistant and non-resistant winter rape. **Methods.** As an explants 7–10 mm fragments of 6-day rapeseed hypocotyls were used to cultivate on the medium, supplemented with 1 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for 12 days at 24°C under dark conditions for the initiation of callusogenesis.

### Висновки

Таким чином, під час проведення біотехнологічних досліджень із культурою тканин озимого ріпаку *Brassica napus* L. *in vitro*, в тому числі відбору трансгенних рослин після генетичної трансформації, в живильному середовищі на етапі формування адвентивних бруньок можна використовувати концентрацію гліфосату 0,1 мМ.

Але в регенераційному середовищі кількість гербіциду слід збільшувати до 0,5 мМ для усунення можливих хибно-позитивних результатів.

For regeneration of plants, the MS nutrient medium was supplemented with 3 mg/L of 6-benzylaminopurine (BAP), 2 mg/L of zeatin, 0.1, 0.5 and 1 mM of glyphosate, respectively. As a control, glyphosate-free regenerative nutrient medium was used. The results were statistically processed using Microsoft Excel. **Results.** It has been shown that glyphosate-susceptible rape explants form leaves and shoots with a frequency up to  $8.3 \% \pm 0.8 \%$  on the medium supplemented with 0.1 mM glyphosate compared to  $57.2 \% \pm 0.6 \%$  in the control. However, the morphogenic structures did not pass selection after transferring shoots to the elongation medium supplemented with 0.1 mM glyphosate. **Conclusions.** For the *in vitro* selection of rapeseed 0.1 mM glyphosate can be used in a nutrient medium at the stage of adventitious buds formation. But at the regeneration stage, the amount of herbicide should be increased to avoid false-positive results.

*Keywords:* winter rapeseed, *Brassica napus* L., *in vitro* culture, selective marker, herbicide, glyphosate.