

УДК 573.6:581.151:633.853.494

С.В. ДОЛГОВ¹, А.П. ФИРСОВ¹, А.С. ПУШИН¹, И.В. ТАРАСЕНКО¹, А.Г. ГОЛИКОВ^{2,*}

¹Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Московская область, г. Пушкино, 142290

²ООО «ГенБит», Москва, 117246

e-mail: golikov@mac.com

Генно-инженерные особенности коммерческого сорта рапса Раудис с «природной устойчивостью» к глифосату

В результате ПЦР с различными праймерами было показано, что яровой рапс сорта Раудис, позиционируемый как природно-устойчивый к глифосату и полученный традиционным методом селекции, является генно-инженерно модифицированным организмом, содержащим генетическую конструкцию, свойственную рапсу линии GT73 (Monsanto). С наличием данной конструкции, вероятно, связана подтвержденная экспериментально устойчивость сорта к глифосату.

Ключевые слова: 5-енолпирувиллициклат-3-фосфатсинтаза, рапс, устойчивость к глифосату.

Устойчивость к гербицидам генно-инженерной природы нашла наиболее широкое применение в сельском хозяйстве среди достижений генной инженерии растений. Так, по данным ISAAA, в 2014 г. в мире более 250 млн. га засевалось биотехнологическими культурами, устойчивыми к гербицидам [1]. Для таких культур, как соя и хлопчатник, доля возделываемых сортов, полученных с помощью методов генной инженерии, преобладает над сортами, полученными с помощью методов классической селекции [1]. Доля площадей, занимаемая биотехнологическим рапсом, составляла в 2014 г. 25% от всех площадей, занятых данной культурой [1], и она продолжает увеличиваться: как сообщает ISAAA, в 2009 г. она составляла 21% [2]. По-видимому, экономическая выгода от

применения биотехнологических сортов способствует такой динамике.

Не так давно наше внимание привлёк сорт ярового рапса Раудис, который широко рекламируется сельскохозяйственными компаниями Украины и предлагается к продаже, в том числе на экспорт [3–7]. Он позиционируется как сорт украинской селекции, природно устойчивый к глифосату, в котором эта устойчивость является результатом традиционного метода селекции без применения генной инженерии. Существование такой природной устойчивости вызывает большие сомнения.

Целью данной работы был генетический анализ сорта рапса Раудис для установления характера факта его устойчивости к гербициду глифосату — природного или генно-инженерного.

Долгов Сергей Владимирович, Фирсов Алексей Петрович, Пушин Александр Сергеевич, Тарасенко Ирина Викторовна, Голиков Александр Григорьевич.

Список сокращений: п.н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; dNTP — дезоксирибонуклеозид трифосфат; EPSPS — 5-енолпирувил-3-фосфошикиматсинтаза; GOX — глифосатоксидаза; ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) — Международная служба по мониторингу за применением агробиотехнологий; P-FMV — 35S-промотор вируса мозаики норичника.

* Автор для переписки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал. В работе применяли семена рапса ярового сорта Раудис, устойчивого к глифосату (оригинатор — ООО «Рапсойл» (Украина) и Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины). Семена рапса проращивали и культивировали в защищенном грунте с использованием торфо-песчаной смеси (торф верховой нейтрализованный) при естественном освещении и температуре 22—24°.

Определение белка EPSPS в растительном материале. Тестирование растительного материала на присутствие белка CP4-EPSPS проводили при помощи экспресс-метода иммунохроматографии на нитроцеллюлозной подложке (Lateral Flow Strip) с использованием набора Roundup Ready® (CP4-EPSPS) Immuno Strip® Test (Agdia Inc., США), согласно методике производителя.

Выделение растительной ДНК. ДНК выделяли из листьев рапса при помощи набора для выделения растительной ДНК «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, США), как описано в прилагаемом производителем набора протоколе.

ПЦР-анализ. Дизайн праймеров для ПЦР проводили при помощи программы VectorNTI или

использовали последовательности праймеров, опубликованные в открытых источниках. Используемые в работе праймеры, их нуклеотидные последовательности и размер ожидаемого продукта представлены в таблице. Амплификацию целевых фрагментов выполняли в буфере, содержащем каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ, каждый праймер в концентрации 0,2 мкМ, около 30 нг геномной ДНК и 1,0 единицу *Taq*-ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва), согласно инструкции производителя; объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Реакцию проводили при следующих условиях: денатурация — 95°, 5 мин; отжиг праймеров — 60°, 30 с; элонгация цепи — 72°, 40 с, количество циклов амплификации — 30 (амплификатор Eppendorf, Германия). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (Amresco, США) в камере для горизонтального электрофореза MINNIE GEL UNIT, 7×10CM (Amersham Biosciences, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали GeneRuler™ Express DNA Ladder #SM0333 и GeneRuler™ Low Range DNA Ladder #SM1191 (Fermentas).

Молекулярное клонирование проводили согласно методикам, описанным Sambrook с сотр. [10].

Таблица

Праймеры, использованные в работе, в том числе для детекции различных структурных элементов каскад экспрессии, присутствующих в растениях рапса линий GT73 (RT73) и GT200 (RT200) (Monsanto), устойчивых к глифосату

Название праймера (целевая последовательность)	Нуклеотидная последовательность праймера в направлении 5'→3'	Длина амплифицируемого фрагмента, п.н.	Ссылка
RT73 Primer 1 (специфичен для линии GT73)	cctattgaccatcactactcattgct	108	[8]
RT73 Primer 2 (специфичен для линии GT73)	gcttatacgaaggcaaaaaagga		
MDB510 (ген <i>cruA</i> рапса)	ggccagggtttccgtgat	101	[8]
MDB511 (ген <i>cruA</i> рапса)	ccgtcgttgtagaaccattgg		
CP4-EPSPS F (ген <i>cp4-epsps</i>)	caacgcaaatctcccttatcgg	274	[9]
CP4-EPSPS R (ген <i>cp4-epsps</i>)	gacctccaacatgaaggacct		
FMVfor (промотор FMV)	cсаааgсctcaааggtcagggt	364	Данная работа
FMVrev (промотор FMV)	cgcattagtгagtgggctgtcagg		
Clon For (ген <i>ctp2cp4-epsps</i>)	atggcgcaagtttagcagaatc	1596	Данная работа
Clon Rev (ген <i>ctp2cp4-epsps</i>)	tcaagcagccttagtgtcg		

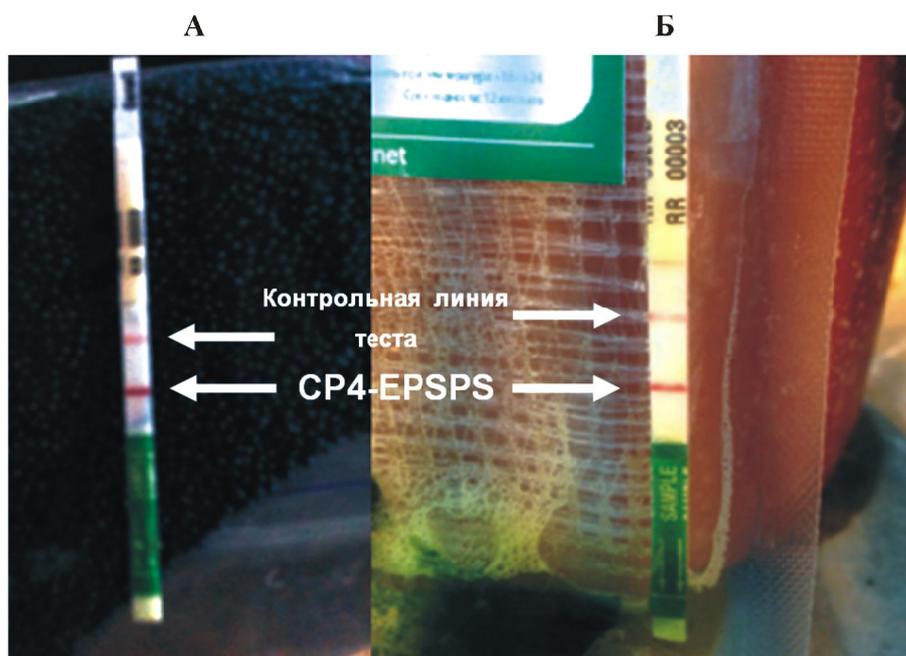


Рис. 1. Тестирование тканей рапса Раудис на наличие белка CP4-EPSPS: А — семена; Б — листья

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена рапса сорта Раудис были высажены в грунт в условиях теплицы. Они характеризовались высокой всхожестью. На стадии вегетации, при образовании 5—6 листьев, растения обрабатывали раствором гербицида Раундап (Monsanto), 5 г/л по глифосату. На протяжении десяти дней у растений рапса сорта Раудис не было отмечено никаких признаков воздействия гербицида, в то время как рост контрольных растений был полностью подавлен (данные не приведены). В качестве контроля использовали растения рапса сорта Ратник селекции ГУ «Всероссийский НИПТИ рапса». Далее семена устойчивого к глифосату рапса использовали для молекулярно-биологического анализа.

Тестирование приобретенных семян рапса сорта Раудис с помощью экспресс-метода иммунохроматографии на нитроцеллюлозной подложке показало наличие в них белка CP4-EPSPS, что однозначно указывает на присутствие в исследуемом рапсе генно-инженерной вставки. Такой же результат был получен при анализе листьев растений рапса, выращенного из анализируемых семян (рис. 1).

Поскольку наличие белка CP4-EPSPS в тканях рапса никак не может быть обусловлено природными причинами, мы предположили, что сорт Раудис является либо уже существующей коммерческой линией генно-модифицированного рапса, устойчивого к глифосату, либо ее производной.

По данным ISAAA [11], существует шесть линий, зарегистрированных и разрешенных к использованию, устойчивость которых связана с экспрессией гена *cp4-epsps* (GT200, GT73 (RT73), MON88302, MON88302 × MS8 × RF3, MON88302 × RF3, MS8 × RF3 × GT73 (RT73)). Первые две линии рапса разрешены для коммерческого использования еще в 1996 и 1995 г., соответственно, другие линии значительно позднее (2010—2015 г.). Поэтому мы решили сосредоточиться на изучении линий GT200 и GT73 (RT73). Схемы генетических конструкций трансгенов этих линий представлены на рис. 2.

Из трех растений рапса сорта Раудис выделяли тотальную ДНК для проведения ПЦР-анализа. Для реакции использовали праймеры RT73 Primer1 и RT73 Primer2, рекомендованные и одобренные Справочной лабораторией Европейского Союза по контролю генно-модифицированных продуктов питания и кормов (CRL-GMFF) в составе Объединенного исследовательского центра (JRC EC) для детекции ДНК линии RT73 (GT73) [8]. Эти праймеры позволяют определять ДНК именно линии RT73 (GT73): верхний праймер (RT73 Primer 1) комплементарен последовательности трансгенной вставки, а нижний праймер (RT73 Primer 2) — последовательности геномной ДНК рапса в районе интеграции трансгенной вставки.

В результате ПЦР с ДНК рапса сорта Раудис амплифицировался фрагмент ожидаемой длины, который не детектировался в контроле (рис. 3, А).

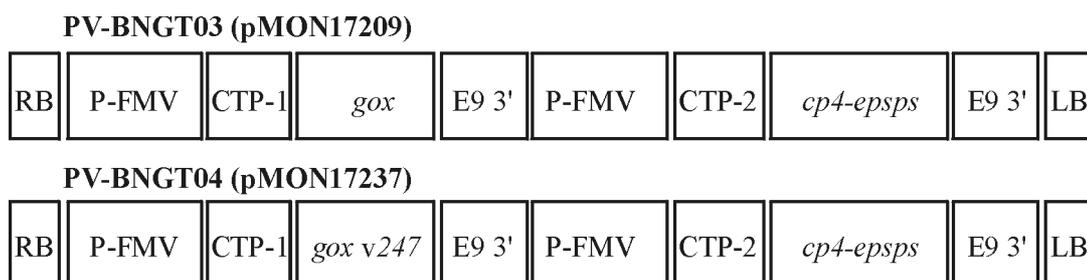


Рис. 2. Структура Т-ДНК-векторов, использованных компанией Monsanto для получения линий рапса, устойчивых к глифосату [13,14]. FMV — 35S-промотор модифицированного вируса мозаики норичника; СТР-1 — N-концевой хлоропластный сигнальный пептид гена малой субъединицы 1А рибулозобисфосфаткарбоксилазы *Arabidopsis thaliana*; *gox* и *gox v247* — синтетический ген, кодирующий глифосатоксидоредуктазу из *Ochrobactrum anthropi* (отличие между первым и вторым в 3 аминокислотных заменах); E9 3' — 3' нетранслируемая часть гена малой субъединицы *rbcS* E9 гороха; СТР-2 — N-концевой хлоропластный сигнальный пептид гена EPSPS *Arabidopsis thaliana*; *cp4-epsps* — синтетический ген на основе гена EPSPS из штамма CP4 *Agrobacterium tumefaciens*; RB — правая, а LB — левая границы векторов

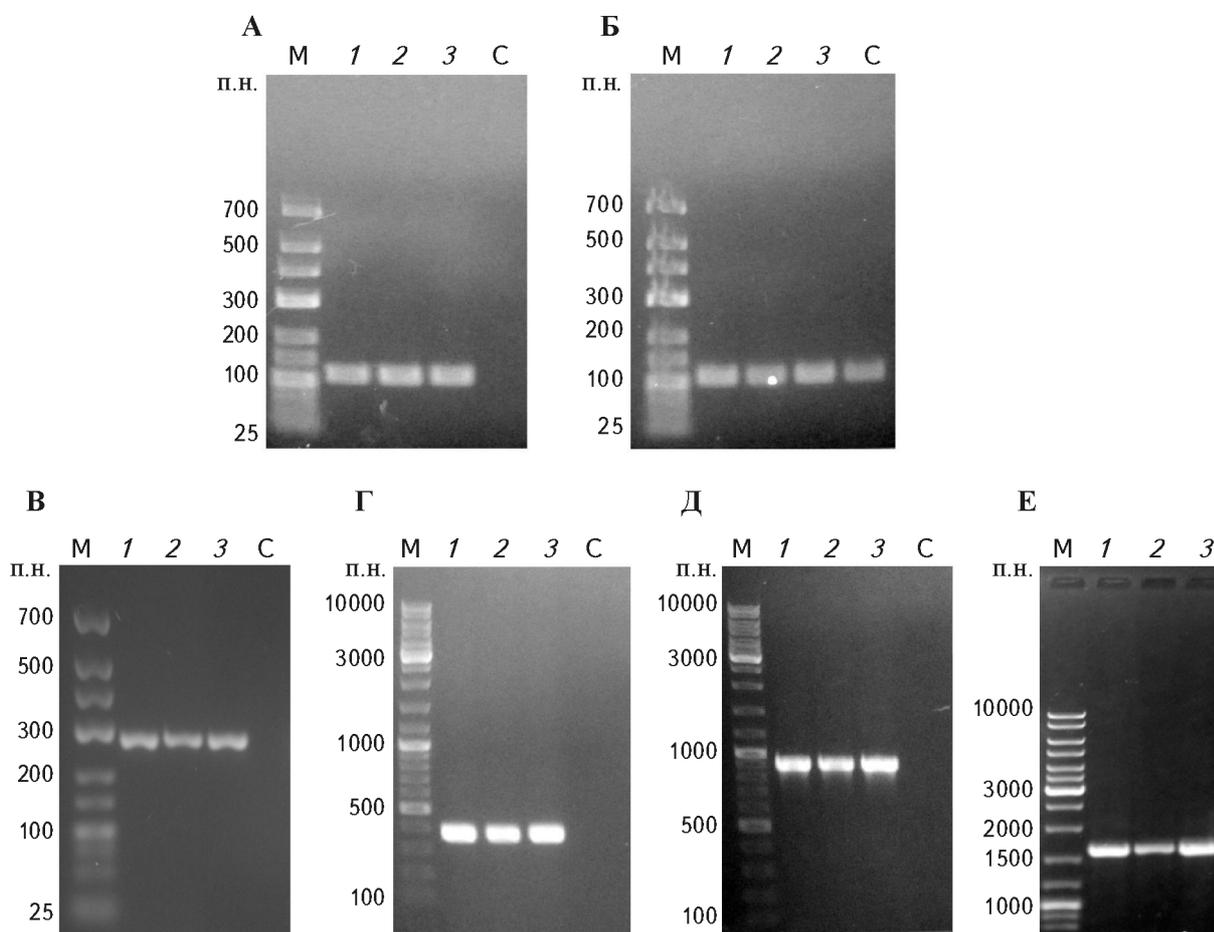


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, выделенной из растений рапса сорта Раудис и Ратник: А — амплификация с использованием праймеров, специфичных для трансгенной линии GT73 (Monsanto); Б — амплификация с использованием праймеров, специфичных к гену *cruA* рапса; В — амплификация с использованием праймеров, специфичных к 35S-промотору модифицированного вируса мозаики норичника FMV; Г — амплификация с использованием праймеров, специфичных к гену, кодирующему белок СТР2-CP4EPSPS; Д — амплификация с использованием комбинации праймеров (прямой праймер специфичен к последовательности промотора FMV, а обратный праймер — к последовательности, кодирующей белок СТР2-CP4EPSPS); Е — амплификация нуклеотидной последовательности гена, кодирующего полноразмерный (1596 п.н.) СТР2-CP4EPSPS с геномной ДНК, выделенной из устойчивых к гербициду растений рапса сорта Раудис. Дорожки 1,2 и 3 — амплифицированный фрагмент ДНК трех растений рапса Раудис; дорожка С — амплифицированный фрагмент ДНК растений рапса сорта Ратник (контроль); М — маркеры молекулярной массы

При этом как в контрольных, так и в анализируемых образцах ДНК в результате ПЦР с использованием праймеров MDB510 и MDB511 [8], специфичных к гену рапса *cruA*, амплифицировался фрагмент ожидаемого размера (см. рис. 3, Б). Это свидетельствует о присутствии в геноме рапса сорта Раудис ДНК, аналогичной ДНК линии GT73 (Monsanto). Дополнительно мы провели ПЦР-анализ с использованием праймеров CP4-EPSPS F и CP4-EPSPS R, специфичных к гену *cp4-epsps*, описанных в работе [9]. Результаты, представленные на рис. 3, В, подтверждают наличие синтетического гена *cp4-epsps* в геноме рапса Раудис.

На основании нуклеотидной последовательности FMV-промотора, обеспечивающего экспрессию синтетического гена *cp4-epsps* [12] в трансгенных линиях рапса, опубликованного в GenBank [9], мы синтезировали праймеры FMVfor (прямой) и FMVrev (обратный), специфичные к последовательности 35S-промотора вируса мозаики норичника (FMV). В результате ПЦР показано присутствие нуклеотидной последовательности FMV-промотора в геноме рапса Раудис (см. рис. 3, Г). Дополнительно провели ПЦР-анализ с комбинацией праймеров FMV for / CP4-EPSPS R (верхний

праймер, специфичный для промотора FMV, а нижний праймер — для гена *cp4-epsps*), который показал, что ген *cp4-epsps* находится под контролем FMV-промотора (см. рис. 3, Д), как и в конструкции PV-BNGT04, использованной компанией Monsanto для получения линии GT73 [13].

Для определения нуклеотидной последовательности гена *cp4-epsps* из рапса сорта Раудис провели его клонирование и последующее секвенирование. Для этого с использованием праймеров (clon for/clon rev), фланкирующих всю транскрибируемую область гена *cp4-epsps*, амплифицировали последовательность, соответствующую по размеру транскрибируемой области *cp4-epsps* 1596 п.н. (см. рис. 3, Е). Этот продукт амплификации клонировали в векторе pAT-TA (Evrogen, Россия). В результате клонирования были получены несколько клонов, из которых выделили плазмидную ДНК, в дальнейшем использованную для секвенирования. Результаты секвенирования показали, что ДНК устойчивых к глифосату растений рапса содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ген *cp4-epsps* (клон pAT-grg6) и совпадающую с опубликованной в GenBank под № GV597339 (рис. 4).

		1	50
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(1)	ATGGCGCAAGTTAGCAGAATCTGCAATGGTGTGCAGAACCCATCTCTTAT	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(1)	ATGGCGCAAGTTAGCAGAATCTGCAATGGTGTGCAGAACCCATCTCTTAT	
		51	100
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(51)	CTCCAATCTCTCGAAATCCAGTCAACGCAAATCTCCCTTATCGGTTTCTC	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(51)	CTCCAATCTCTCGAAATCCAGTCAACGCAAATCTCCCTTATCGGTTTCTC	
		101	150
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(101)	TGAAGACGCAGCAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTTCGTCGTCGTGGGGA	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(101)	TGAAGACGCAGCAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTTCGTCGTCGTGGGGA	
		151	200
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(151)	TTGAAGAAGAGTGGGATGACGTTAATGGCTCTGAGCTTCGTCCTCTTAA	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(151)	TTGAAGAAGAGTGGGATGACGTTAATGGCTCTGAGCTTCGTCCTCTTAA	
		201	250
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(201)	GGTCATGTCTTCTGTTTCCACGGCGTGCATGCTTCACGGTGCAAGCAGCC	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(201)	GGTCATGTCTTCTGTTTCCACGGCGTGCATGCTTCACGGTGCAAGCAGCC	
		251	300
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(251)	GTCCAGCAACTGCTCGTAAAGTCTCTGGTCTTTCTGGAACCGTCCGTATT	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(251)	GTCCAGCAACTGCTCGTAAAGTCTCTGGTCTTTCTGGAACCGTCCGTATT	
		301	350
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(301)	CCAGGTGACAAGTCTATCTCCACAGGTCCTTCATGTTTGGAGGTCTCGC	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(301)	CCAGGTGACAAGTCTATCTCCACAGGTCCTTCATGTTTGGAGGTCTCGC	
		351	400
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(351)	TAGCGGTGAAACTCGTATCACCGGTCTTTTGGGAAGGTGAAGATGTTATCA	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(351)	TAGCGGTGAAACTCGTATCACCGGTCTTTTGGGAAGGTGAAGATGTTATCA	
		401	450
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(401)	ACACTGGTAAGGCTATGCAAGCTATGGGTGCCAGAATCCGTAAGGAAGGT	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(401)	ACACTGGTAAGGCTATGCAAGCTATGGGTGCCAGAATCCGTAAGGAAGGT	
		451	500
СТР2СР4ЕPSPS из GT73	(451)	GATACTTGGATCATTGATGGTGTGGTAACGGTGGACTCCTTGCTCCTGA	
СТР2СР4ЕPSPS из Раудис	(451)	GATACTTGGATCATTGATGGTGTGGTAACGGTGGACTCCTTGCTCCTGA	

Рис. 4. Сравнение нуклеотидных последовательности гена *СТР-2/СР4ЕPSPS* из GT73 (GenBank № GV597339, фрагмент с 1 по 500 п.н.) и последовательности, клонированной из генома анализируемых растений рапса сорта Раудис (клон pAT-grg6). Жирным шрифтом выделена последовательность *cp4-epsps*, обычным — хлоропластный сигнальный пептид

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что рапс сорта Раудис является устойчивым к глифосату генно-инженерно модифицированным организмом, содержащим нуклеотидные последовательности, свойственные рапсу линии GT73 (Monsanto) [14].

Следует учесть, что посевные площади, занятые рапсом в Украине, приближаются к 1 млн. га, а ежегодный экспорт рапса оценивается в 1,2—2,1 млн. т [15].

Полученные результаты убеждают нас в необходимости скорейшего создания государственной системы скрининга/мониторинга генно-инженерных сельскохозяйственных растений и их семян.

Получено 10.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. James, C. Global Status of commercialized biotech/GM crops: ISAAA Brief No. 49. — Ithaca, NY: ISAAA, 2014. (<http://www.isaa.org/purchasepublications/itemdescription.asp?ItemType=BRIEFS&Control-IB049-2014>).
2. James, C. Brief: Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009 //ISAAA Brief 41. — Ithaca, NY: ISAAA, 2009. — С. 290.
3. АгроПрайд. <http://www.agropride.com/index.php/jarovoy-raps/137-raudis.html/> (последнее посещение 01.09.2015).
4. АгроУкраина. <http://www.agro-ukraine.com/ru/trade/m-271488/semena-rapsa-raudis/> (последнее посещение 01.09.2015).
5. Агротендер. <http://www.agrotender.com.ua/board/post-123407.html> (последнее посещение 01.09.2015).
6. http://www.farmer.co.ua/market/index.php?f_no=7977 (последнее посещение 01.09.2015).
7. Государственный реестр сортов растений, пригодных для распространения на Украине, на 2015 год. (20.08.2015 г.). — Киев, 2015. — 366 с. http://www.vet.gov.ua/sites/default/files/Reestr-20_08_2015.pdf
8. Mazzara, M, Grazioli, E, Savini, C, Van Den Eede, G. Event-Specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol - Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. — Luxembourg: Office for official publications of the European Communities, 2007. — 44 p.
9. Demeke, T. Development of a polymerase chain reaction assay for detection of three canola transgenes / T. Demeke, R.W. Giroux, S. Reitmeier, S.L. Simon // J. Amer. Oil. Chem. Soc. — 2002. — V. 79. — P. 1015—1019.
10. Sambrook, J., Russell, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. — 3rd ed. — New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
11. ISAAA. <http://www.isaaa.org> (последнее посещение 01.09.2015).
12. Barry, G.F., Kishore, G.M. Gluphosate tolerant plants // US5463175, C12N 5/14; C12N 15/53; C12N 15/82; A01H 5/00. 1995.
13. Application for authorization to place on the market GT73 oilseed rape in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. http://www.gmocompass.org/pdf/regulation/rapeseed/GT73_rapeseed_application_food_feed_2010.pdf
14. Request for Extension of Determination of nonregulated status to glyphosate-tolerant canola *Brassica napus* event gt200, 01-CA-O69U, Monsanto Company, 2001. http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/01_32401p.pdf (последнее посещение 01.09.2015).
15. AGCanada. <http://www.agcanada.com/daily/ukraine-to-double-rapeseed-exports-in-201314-analyst> (последнее посещение 01.09.2015).

S.V. DOLGOV¹, A.P. FIRSOV¹, A.S. PUSHIN¹,
I.V. TARASENKO¹, and A.G. GOLIKOV^{2,*}

¹ The Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Pushchino branch, 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia

² Limited Liability Company *GenBit*, 117246, Moscow Russia

e-mail: golikov@mac.com

Gene-Engineered Details of a Raudis Commercial Rapeseed Variety *Naturally Tolerant* to Glyphosate

As a result of PCR with various primers, it has been shown that the summer rape breed Raudis that was characterized as naturally resistant to glyphosate and obtained by the conventional selection method is a genetically modified organism that contains a gene construct typical of the rape line GT73 (Monsanto). This construct seems to be responsible for the experimentally confirmed glyphosate-resistance of the breed.

Key words: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, glyphosate-resistance, rape.

* Author for correspondence.