

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАРИАНТОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА *aroA* СО СНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ

Е.А. Николайчик, Н.Н. Гущинская, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Современное интенсивное сельское хозяйство невозможно без широкого применения гербицидов, однако их использование зачастую создает целый ряд экологических проблем, в первую очередь с токсичностью большинства гербицидов для животных (в том числе человека) и последующих посевов сельскохозяйственных культур. N-фосфометилглицин (глифосат) является фактически единственным из широко используемых в настоящее время гербицидов с низкой токсичностью для животных. Популярность глифосата обусловлена также дешевизной его производства и эффективным подавлением роста практически всех видов растений.

Механизм действия глифосата основан на специфическом и эффективном ингибировании 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) – ключевого фермента биосинтеза ароматических соединений у бактериальных и растительных организмов. Низкая токсичность глифосата для животных (LD₅₀=5,6 г/кг веса при внутреннем употреблении в экспериментах на крысах) обусловлена отсутствием у них пути биосинтеза ароматических соединений, ингибируемого этим гербицидом [1]. С другой стороны, присутствие чувствительного к ингибированию глифосатом фермента EPSPS позволяет добиться эффективного подавления роста практически всех видов растений.

Тем не менее, существенный экономический эффект от применения глифосата возможен только при наличии устойчивых к этому гербициду сельскохозяйственных культур, что делает возможной их обработку (и полное подавление сорняков) в течение вегетации.

Первым шагом в работе по созданию трансгенных растений, обладающих устойчивостью к глифосату, является поиск гена, наличие которого в растительной клетке обеспечит функционирование процесса биосинтеза ароматических соединений даже в присутствии гербицида. Принципиально возможны два пути для достижения этой цели. Первый предполагает выделение бактерий, устойчивых к высоким концентрациям глифосата с последующей идентификацией гена, определяющего эту устойчивость, и введение его в геном растения. Второй – клонирование гена, продукт которого (EPSPS) является мишенью для данного гербицида, и последующая его модификация за счет сайт-направленного мутагенеза для снижения чувствительности к глифосату. Первый подход использовать в условиях Беларуси затруднительно из-за того, что глифосат пока очень мало используется и, следовательно, природные сообщества микроорганизмов не обогащены глифосатустойчивыми формами. Поэтому в настоящей работе был использован второй подход.

Методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды приведены в таблице 1.

Культивирование микроорганизмов осуществлялось на бактериальных питательных средах при температуре 37°C (*E. coli*) и 28°C (*Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora*), для определения минимальной ингибирующей концентрации глифосата использовалась минимальная глюкозо-солевая среда с добавлением 0,5 ммоль/л ИПТГ.

Коммерческие препараты антибиотиков использовались в необходимых концентрациях.

Электротрансформация клеток, трансформация с помощью хлорида кальция, выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий выполнялись в соответствии со

стандартными протоколами [2]. В данной работе были использованы ферменты и буферные смеси фирм MBI Fermentas и New England Biolabs. Рестрикция, лигирование проводилось согласно протоколам фирм производителей.

Таблица 1 – Штаммы и плазмиды

Штаммы/плазмиды	Генотип	Источник
Штаммы		
<i>Pectobacterium carotovorum</i> 3-2	штамм дикого типа	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 21A	штамм дикого типа	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Erwinia amylovora</i> E3	штамм дикого типа	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Dickeya dadantii</i> ENA49	штамм дикого типа	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	F ['] ::Tn10 (Tet ^r) <i>pro A</i> + <i>B</i> + <i>lac</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r)	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ['] φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁻) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	коллекция кафедры молекулярной биологии
<i>Escherichia coli</i> JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F ['] <i>traD36 proAB lacI</i> ^q ZΔM15]	коллекция кафедры молекулярной биологии
Плазмиды		
pAlter-1	oriV _{ColE1} , Tet ^R	Promega
pBluescript II KS:: <i>aroAG96A</i> , A183T	pBluescript II KS с геном <i>aroA</i> (<i>E.coli</i>) G96A, A183T	Ярмолинский Д.Г., Картель Н.А.
pZH475	pAlter-1:: <i>aroA</i> из <i>E.coli</i> JM109	Получена в этой работе
pZH476	pAlter-1:: <i>aroA</i> из <i>D. dadantii</i> ENA49	Получена в этой работе
pZH477	pZH475 с мутацией P101S в гене <i>aroA</i> (<i>E.coli</i>)	Получена в этой работе
pZH478	pZH475 с мутациями T42M и P101S в гене <i>aroA</i> (<i>E.coli</i>)	Получена в этой работе
pZH479	pZH476 с мутацией P101S в гене <i>aroA</i> (<i>D. dadantii</i>)	Получена в этой работе
pNG484	pAlter-1:: <i>aroA</i> (<i>E.coli</i>) G96A, A183T	Получена в этой работе

Аmplификацию ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием программируемого термостата PTC200.

Для проведения секвенирующих реакций применяли набор реактивов AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) или CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas) и следовали протоколам фирм производителей. Электрофорез и регистрацию продуктов реакции проводили при 35 Вт и +55°C на ДНК-анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) с соответствующим программным обеспечением. Анализ результатов полученной нуклеотидной последовательности проводили с помощью программного пакета ALFwin 2.1 (Amersham Pharmacia Biotech).

Сайт-направленный мутагенез осуществляли с помощью набора реактивов Altered Sites II (Promega) согласно протоколам производителя.

Результаты и обсуждение

Анализ геномных последовательностей позволил разработать праймеры для амплификации гена *aroA* нескольких видов бактерий, имеющих в коллекции кафедры молекулярной биологии: *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora*, а также *Escherichia coli*. В праймеры для амплификации были введены последовательности рестрикционных сайтов, необходимые для последующих стадий клонирования. Поскольку внесение изменений в аминокислотную последовательность планировалось в дальнейшем осуществлять с помощью системы сайт-направленного мутагенеза в специализированном векторе pAlter-1, не предназначенном для экспрессии белков, потребовалось также введение в состав праймеров последовательности рибосомсвязывающего сайта для обеспечения эффективной экспрессии в клетках бактерий.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для амплификации генов *aroA* из различных видов бактерий

Название праймера	Последовательность праймера
aroAf_erw	TTTCTGCAGGAGATTTCCCATGGAGGAATCCCTGAC
aroAf_coli	TGTCTGCAGGAGATGAGTCCCATGGAATCCCTGAC
aroAr_amyl	CCGGAGCTCATGCCAGCTGGCTGATGCG
aroAr_dad	TCAGAGCTCAGCCGTGCTGACTCAGA
aroAr_pect	AATGAGCTCACGCTAGTTCGCTGAGACG
aroAr_coli	CCGGAGCTCAGGCTGCCTGGCTAATC

Вследствие высокой консервативности 5'-концов исследуемых генов удалось ограничиться всего двумя «прямыми» праймерами: aroAf_coli для амплификации *aroA* *E. coli* и aroAf_erw для амплификации искомого гена всех остальных упомянутых выше бактерий. «Обратные» праймеры являются видоспецифичными за исключением aroAr_pect, который необходим для амплификации генов *aroA* обоих видов *Pectobacterium*.

Для выявления возможных различий в чувствительности к глифосату продукта неизменного гена *aroA* бактерий видов *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *E. amylovora*, *D. dadantii* и *E. coli* для клеток этих бактериальных штаммов была определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) глифосата. Поскольку различий между штаммами выявлено не было (МИК во всех случаях составила 0,5 ммоль/л), в дальнейшей работе в качестве матриц для амплификации использовали хромосомную ДНК штаммов белорусских изолятов *P. carotovorum* 3-2, *P. atrosepticum* 21A, *E. amylovora* E3, а также *D. dadantii* ENA49 и *E. coli* JM109.

В реакции ПЦР были получены продукты амплификации ожидаемого размера (около 1,3 т.н.п.) для всех ДНК-матриц (кроме *P. carotovorum* 3-2, для которой количество специфического продукта было слишком малым и увеличить его за счет оптимизации условий не удалось), однако рестрикционный анализ полученных ПЦР-продуктов показал присутствие сайта для действия *Pst*I в составе фрагмента, амплифицированного из генома *P. atrosepticum* 21A, и сайта *Sac*I во фрагменте из *E. amylovora* E3, что существенно осложняло последующее молекулярное клонирование амплифицированных фрагментов. Таким образом, дальнейшая работа проводилась только с генами *aroA*, амплифицированными из геномов *E. coli* и *D. dadantii*.

Амплифицированные фрагменты ДНК, содержащие гены *aroA* *E. coli* и *D. dadantii*, были обработаны рестриктазами *Pst*I и *Sac*I, после чего клонированы по тем же сайтам в векторе pAlter-1. Наличие искомой вставки в рекомбинантных плазидах было подтверждено рестрикционным анализом, а также функциональным тестом. Сконструированные таким образом плазмиды получили обозначения pZH475 (с геном из *E. coli*) и pZH476 (с геном из *D. dadantii*).

Клетки штамма *E. coli* JM109 с векторной плазмидой pAlter-1 не растут на средах с концентрацией глифосата 0,5 ммоль/л и выше, тогда как клетки этого же штамма, несущие плазмиду (pZH475) с геном *aroA*, клонированным из *E. coli*, в условиях индукции

0,5 ммоль/л ИПТГ формировали изолированные колонии при концентрации 0,5 ммоль/л глифосата, а с геном *D. dadantii* (pZH476) – при 1 ммоль/л глифосата. Таким образом, немодифицированный ген *D. dadantii* обеспечивает в два раза более высокий уровень устойчивости к глифосату, чем ген *E. coli*. Тем не менее, уровень устойчивости к этому гербициду, который можно ожидать после внесения немодифицированных бактериальных генов *aroA* в геном растений, будет явно недостаточным для обеспечения полевой устойчивости к рабочим концентрациям гербицида. В этой связи был проведен сайт-направленный мутагенез клонированных генов *aroA* из *E. coli* и *D. dadantii* для введения нуклеотидных замен, меняющих ключевые аминокислотные остатки у кодируемого этими генами белкового продукта (EPSPS) и снижающих его чувствительность к глифосату.

Анализ литературных данных показал, что повысить устойчивость EPSPS к глифосату могут одиночные замены пролина на серин в 101 положении (P101S) [3]; треонина на метионин в 42 позиции (T42M) [4,5], а также глицина на аланин в 96 положении (G96A) [6]. Поскольку последняя замена резко снижает каталитическую активность фермента [6,7], на первом этапе работы в клонированные гены были введены первые две замены.

Поскольку штамм *D. dadantii* ENA49, который использовался в работе, отличен от штамма *D. dadantii* 3937, последовательность гена *aroA* которого есть в базе данных, для корректного анализа и мутагенеза этого гена, была определена его полная нуклеотидная последовательность. Для этого было амплифицировано несколько внутренних участков гена *aroA*, так как нужно было получить полную последовательность довольно протяженного гена размером около 1300 н.п. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов позволило определить полную последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49 (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49 по сравнению с последовательностью гена *aroA* штамма *D. dadantii* 3937 имеет несколько нуклеотидных замен. Большинство из них являются незначительными (не меняется кодируемая аминокислота), это такие замены как: замена 129 кодона CAT на CAC (гистидин), 167 кодона GAC на GAT (глутамин), 260 кодона GGA на GAA (аспартат), 269 кодона CGC на CGT (глицин), 316 кодона GCG на GCA (аланин), 324 кодона GCG на GCA (аланин) и замена 341 кодона CGC на CGA (аргинин). Также были обнаружены три нуклеотидные замены, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности: замена второго кодона GAG на CAG (глутамат на глутамин), 79 кодона GTG на GGG (валин на глицин) и 366 кодона TAT на CAT (тирозин на гистидин).

Для введения искомым мутаций в клонированные гены использовались следующие олигонуклеотиды:

```
T42M_coliCTATCCAGCAGATTCATTAATACTGTTTT
P101S_coliGCCGCCAGCGAACGCATTGCC
P101S_dadGCGGCGGCCAGCGAGCGCATCGC
```

Полученные после мутагенеза рекомбинантные плазмиды были введены с помощью электротрансформации в клетки штамма *E. coli* JM109. Отбор рекомбинантных клонов производился на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей глифосат в концентрации 2,5 ммоль/л и 0,5 ммоль/л ИПТГ в качестве индуктора. В результате были отобраны плазмиды с тремя типами замен: производные плазмиды pZH475 (с геном *E. coli*) с заменой P101S и двойной заменой T42M и P101S, а также производные плазмиды pZH476 (с геном из *D. dadantii*) с одиночной заменой P101S. Первые две мутантные плазмиды получили обозначения соответственно pZH477 (замена P101S) и pZH478 (замены T42M и P101S), а третья – pZH479 (замена P101S).

```

ATGGAGGAATCCCTGACCCTACAACCGATTTTCATTGATTAACGGCAGCATCAATCTGCCGGGTTCCAAAAGTGTTCCTCAA 80
  C
M E E S L T L Q P I S L I N G T I N L P G S K S V S N +1
  Q
CCGTGCGTTGTTGCTGGCGGCATTGGCAAGAGGCCACCTCGCCTGACCAACCTGCTGGACAGCGACGATGTCGTCATA 160
  R A L L L A A L A R G T T R L T N L L D S D D V R H +1
TGCTCAATGCGCTGAGCGCGCTGGGTGTTGAATATCGCCTGTCTGGACAGCCGCACAGAGTGCAGAAATCGTCGGGGTGGGG 240
  M L N A L S A L G V E Y R L S D S R T E C E I V G V G +1
  G
GGCGCATTAACGGCGTCTACGCCGTTGGAAGTGTGTTTGGGAATGCCGGGACGGCGATGCGCCCGCTGGCCGCCGCGCT 320
  G A L T A S T P L E L F L G N A G T A M R P L A A A L +1
GTGCCTGACTGATGGCGATATCGTGTGACCGGCGAACC CGTATGAAAGAACGTCCGATTGGTCATCTGGTGGATGCGT 400
  C L T D G D I V L T G E P R M K E R P I G H L V D A +1
  H
TGCGGCAGGGGGGCGCGCTATCGACTATCTGGAGCAGGAAAATTATCCGCCGTTGCGCCTGCAAGGGGGCTTTACAGGT 480
  L R Q G G A R I D Y L E Q E N Y P P L R L Q G G F T G +1
GGAGATATCAGTGTAGACGGTTCGGTATCCAGCCAGTTTCTCACTGCGCTGCTAATGACGGCGCCGCTGGCTGTGCAGGA 560
  G D I S V D G S V S S Q F L T A L L M T A P L A V Q D +1
TACGCGCATCAGCATAAAGGCGATCTGGTTTCCAAACCTTATATCGACATCACCCCTGCATATGATGGAAACCTTCGGCA 640
  T R I S I K G D L V S K P Y I D I T L H M M E T F G +1
TCACGGTATCAATAACGATTACCAGACTTTCGTGGTGCCTGGTAATCAGCATTATCAGTCGCCTGGGCACTATCTGGTG 720
  I T V I N N D Y Q T F V V A G N Q H Y Q S P G H Y L V +1
GAGGGCGACGCCTCGTCCGCATCTTATTTTCTGGCGGCAGCGCTATTCGGGGGGGACGGTACGTGTGACCGGCGTCCG 800
  E G D A S S A S Y F L A A A A I R G G T V R V T G V G +1
  G
CCGCCATAGCGTGCAGGGCGATATCCGTTTCGCCGACGTGCTGGAGAAAATGGGCGCGGAGATCCGCTGGGGTGACGACT 880
  T
R H S V Q G D I R F A D V L E K M G A E I R W G D D +1
  R
ATATCGAATGTGACGCGGTAATCTCCACGCCATCGATATGGACATGAACCATATCCCCGACGCGGCAATGACCATCGCC 960
  Y I E C Q R G N L H A I D M D M N H I P D A A M T I A +1
  A
ACTGCCGCGCTGTTTGCCGAAGGTGGGACGACGACGCTGCGTAACATCTATAACTGGCGCGTGAAAGAAACCGATCGTCT 1040
  A
T A A L F A E G G T T T L R N I Y N W R V K E T D R L +1
GGCAGCTATGGCGACGGAAGTGCAGCAAGGTCGGCGCCGAGGTGGAAGAAGGGTATGATTACATCCGCATTACGCCGCCAA 1120
  A A M A T E L R K V G A E V E E G Y D Y I R I T P P +1
  H
CGCAGCTGAAAGCCGCTGAAATCGGCACCTTACAATGACCACCGTATGGCGATGTGCTTCTCGCTGGTGGCGTTGTCTGAC 1200
  T Q L K A A E I G T Y N D H R M A M C F S L V A L S D +1
ACGCCGGTACCATCTCGACCCTAAATGTACCGCCAAAACGTTCCCGGATTAATTCTGCAACTGGAGCGTCTGAGTCA 1280
  T P V T I L D P K C T A K T F P D Y F L Q L E R L S Q +1
GCACGGCTGA 1290
  H G * +1

```

Рисунок 1 – Последовательности гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49 и его белкового продукта. Отличия от нуклеотидной и аминокислотной последовательностей гена *aroA* штамма *D. dadantii* указаны подстроечно.

Еще один вариант гена *aroA* из *E. coli* с двумя мутациями G96A и A183T, которые описаны в литературе, как повышающие устойчивость белкового продукта гена *aroA* к глифосату, был предоставлен нам сотрудниками Института Генетики и Цитологии АН РБ. Чтобы оценить эффективность работы гена *aroA E. coli* G96A, A183T в бактериальной клетке, этот ген был клонирован в бактериальном векторе экспрессии pAlter-1. Поскольку в составе исходной конструкции и вектора pAlter-1 не содержалось удобных сайтов для молекулярного клонирования, последовательность гена *aroA* G96A, A183T была амплифицирована в ходе реакции ПЦР с использованием праймеров agoAf_coli и agoAg_coli. Амплифицированный фрагмент ДНК, содержащий гены *aroA E. coli* с заменами G96A и A183T, был обработан рестриктазами *PstI* и *SacI*, после чего клонирован по тем же сайтам в векторе pAlter-1. Наличие вставки необходимого размера было подтверждено с помощью рестрикционного анализа с использованием ферментов *EcoRI* и *HindIII* и функциональным тестом на минимальной глюкозо-солевой среде с добавлением глифосата в концентрации 2,5 ммоль/л и 0,5 ммоль/л ИПТГ в качестве индуктора. Одна из рекомбинантных плазмид получила название pNG484 и использовалась в дальнейшем.

Эффективность ферментов EPSPS оценивалась по жизнеспособности клеток штаммов *E. coli* DH5 α и JM109 на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей различные концентрации гербицида. Поскольку фермент 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфатсинтаза участвует в биосинтезе ароматических аминокислот и у растительных, и у бактериальных организмов, то по результатам, полученным при проверке устойчивости бактериальных клеток к глифосату, можно судить о чувствительности измененных ферментов EPSPS к ингибированию этим гербицидом. Чашечный микробиологический тест является простым, удобным и показательным для этой цели.

Эффективность мутантных вариантов генов *aroA* была проверена с помощью метода реплик на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей более высокие концентрации глифосата: 5, 10 и 20 ммоль/л.

Как видно из таблицы 3, МИК глифосата для клеток штаммов *E. coli* DH5 α и JM109 с одной и той же плазмидой не отличались, однако наблюдалась существенная разница между устойчивостью к глифосату клеток с различными версиями мутантных генов. Наиболее устойчивыми оказались продукты генов *aroA* из *D. dadantii* с одиночной заменой P101S и *E. coli* с заменами G96A и A183T (МИК=20 ммоль/л). Продукт гена *aroA* из *E. coli* с одиночной заменой P101S оказался в четыре раза более чувствительным (МИК=5 ммоль/л), а наличие еще одной замены (T42M) повышало устойчивость его продукта в два раза (МИК=10 ммоль/л).

Таблица 3 – Рост клеток штаммов *E. coli* DH5 α и JM109, содержащих плазмиды pZH477, pZH478, pZH479 и pNG484, на среде с различными концентрациями глифосата.

Концентрация глифосата, ммоль/л	Штамм <i>E. coli</i> и плазида							
	DH5 α pZH477	JM109 pZH477	DH5 α pZH478	JM109 pZH478	DH5 α pZH479	JM109 pZH479	DH5 α pNG484	JM109 pNG484
0	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5	+	+	+	+	+	+	+	+
5	–	–	+	+	+	+	+	+
10	–	–	–	–	+	+	+	+
20	–	–	–	–	–	–	–	–

Выводы

Таким образом, в настоящей работе осуществлена амплификация и клонирование гена *aroA* из нескольких видов энтеробактерий, что позволило нам отобрать наиболее перспективные варианты генов *aroA* в отношении устойчивости их продуктов к ингибированию глифосатом. Два гена с наиболее выгодными характеристиками использовались нами для внесения аминокислотных замен с помощью сайт-направленного мутагенеза. Этот подход позволил нам отобрать варианты генов *aroA*, наличие которых в бактериальных клетках повышает устойчивость их к глифосату (МИК глифосата в 40 раз выше по сравнению с неизмененными генами). Наиболее устойчивыми оказались продукты генов *aroA* из *D. dadantii* с одиночной заменой P101S и *E. coli* с заменами G96A и A183T (МИК=20 ммоль/л). В дальнейшем планируется оценить эффективность работы полученных в настоящей работе мутантных генов в клетках растений.

Список литературы

1. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // М: Мир. – 1984. – С. 480.
2. Comai, L. An Altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate / L. Comai, Sen L.C., Stalker D.M., // Science. – 1983. – Vol. 221. – P. 370–371.
3. Giesy, J.P. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide / J.P. Giesy, S. Dobson, K.R. Solomon // Rev. of Env. Cont. Tox. – 2000. – Vol. 167. – P. 35–120.
4. He, M. A T42M substitution in bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate / M. He, Y.F. Nie, P. Xu // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – Vol 67. – P. 1405–1409.
5. He, M. A new type of class I bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate / M. He, Z.Y. Yang, Y.F. Nie, J. Wang // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1568. – P. 1–6.
6. Kahrizi, D. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate / D. Kahrizi, A.H. Salmanian, A. Afshari, A. Moieni, // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26. – P. 95–104.
7. Padgette, S.R. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site / S.R. Padgette [et al.] // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 22364–22369.

CONSTRUCTION OF BACTERIAL GENE *ARO A* VARIANTS WITH LOWER SENSITIVITY TO HERBICIDE GLYPHOSATE.

Y.A. Nikolaichik, N.N. Guschinskaya, A.N. Evtushenkov
Belarusian State University, Minsk, Belarus

Glyphosate is a broad-spectrum herbicide that inhibits 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). It is a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthesis pathway of microorganisms and plants. Glyphosate enables efficient weed control with minimal animal, human and environmental toxicity. One approach to create transgenic plants with tolerance to glyphosate is to introduce in their genomes bacterial enzymes with lower sensitivity to herbicide. We cloned *aroA* genes from several bacterial strains and chose the most perspective variants (genes from *E. coli* and *D. dadantii*) in order to construct *aroA* with tolerance to glyphosate. We used site-directed mutagenesis to obtain altered genes with 40-fold lower sensitivity to glyphosate.