

САХНО Л.А.<sup>1</sup>, ОСТАПЧУК А.Н.<sup>2</sup>, КЛОЧКО В.В.<sup>2</sup>, БАННИКОВА М.А.<sup>1</sup>,  
КУЧУК Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148,  
e-mail: sakhno2007@ukr.net

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины  
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

## ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *суп11А1* ЦИТОХРОМА P450<sub>SCC</sub> ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Цитохромы P450 — цитохром-зависимые могооксигеназы — это белки, вовлечённые в процессы биосинтеза регуляторных соединений, в том числе стероидных гормонов [1]. Растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1, в ядро которых был интегрирован ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения, опережали контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития, характеризовались увеличением количества растворимого белка, растворимых и нерастворимых углеводов, возрастом биомассы [2]. Наблюдаемый фенотипический эффект авторы объясняли влиянием новых биологически-активных стероидных веществ, не характерных для растений дикого типа. В нашей лаборатории были получены биотехнологические растения сельскохозяйственно ценных видов — рапса [3] и картофеля [4], в ядерный геном которых был введён упомянутый выше ген.

Поскольку рапс является третьей по количеству производимого растительного масла (после пальмы и сои [5]) масличной культурой в мире, представляло интерес изучение влияния введённого гена на качественный и количественный состав жирных кислот в трансформированных растениях рапса.

### Материалы и методы

**Растительный материал.** В качестве анализируемого материала использовали выращиваемые в условиях закрытого грунта и в условиях асептической культуры трансформированные растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., сорт Мария), несущие в ядерном геноме ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка [3].

**Газовая хромато-масс-спектрометрия эфиров жирных кислот.** Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили одноэтапно по методике [6]. Для определения использовали семена, полученные при самоопылении растений исходного сорта и первичных трансформантов в условиях теплицы. Кроме того, анализировали состав жирных кислот в листьях трансформантов T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>-поколения.

Для приготовления образцов навеску семян (50 мг) измельчали в ступке, переносили в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками, кото-

рые имели тефлоновые прокладки, и добавляли сначала 3,3 мл реакционной смеси, состоявшей из метанола:толуола: $H_2SO_4$  в объёмном соотношении 44:20:2, затем 1,7 мл гексана. Пробирки выдерживали на водяной бане при 80 °С в течение 2 час. После охлаждения при комнатной температуре отбирали верхнюю фазу, в которой и концентрировались образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот. рН раствора доводили до нейтрального насыщением 1н раствором фосфата натрия.

Жирные кислоты из листьев выделяли аналогично, используя 400 мг нарезанных скальпелем листьев для каждой пробы. Полученные образцы имели рН раствора, не требующий изменений перед проведением анализа.

Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м·0,25мм·0,25мкм) (J&W Scientific). Температурная программа от 150 °С до 220 °С с градиентом 2°/мин, температура испарителя — 250 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Идентификацию проводили при помощи библиотеки масс-спектров NIST 02 и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco).

### Результаты и обсуждение

Анализ спектров жирных кислот, выделенных из листьев  $T_0$  и  $T_1$  поколения трансформантов, показал, что качественный состав жирных кислот остаётся без изменений (рис. А).

Отмечено, что у первичных трансформантов значительно повышается доля ненасыщенной пальмитиновой (C16:0) кислоты, меньше меняются

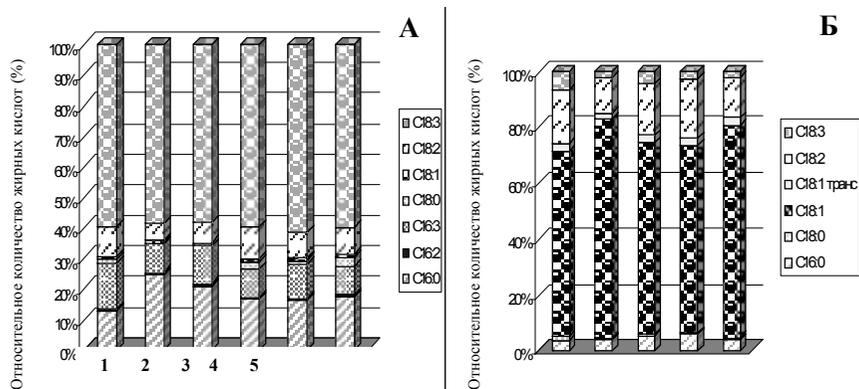


Рис. Относительное количество жирных кислот:

А — в листьях: 1 — исходный рапс, сорт Мария, 2, 3 — первичные трансформанты, линии  $T_0$  12/93/14 и  $T_0$  12/93/18), 4, 5, 6 — трансформанты  $T_1$ -поколения (линии  $T_1$  12/93/26,  $T_1$  12/93/126,  $T_1$  12/93/14в); Б — в масле семян: 1 — исходный рапс, сорт Мария, 2–5 —  $T_1$ -поколение трансформантов (линии  $T_1$  12/93/14в,  $T_1$  12/93/1а,  $T_1$  12/93/26,  $T_1$  12/93/126)

количества С16:3 кислоты, падает почти вдвое синтез линолевой (С18:2) кислоты. Доля основной для листьев рапса жирной кислоты — линоленовой (С18:3) остаётся без изменений (рис. А).

В первом поколении трансформированных растений продолжают наблюдаться изменения в соотношении жирных кислот. Доля пальмитиновой кислоты снижается по сравнению с первичными трансформантами, но остаётся выше, чем у исходных растений. Синтез С16:3 кислоты уменьшается по сравнению с таковым у растений  $T_0$  и становится ещё ниже, чем в исходных растениях. За счёт этого происходят изменения и в соотношении линолевой и линоленовой кислот: доля линолевой повышается и становится равной (линия  $T_1$  12/93/26) или незначительно меньшей (линии  $T_1$  12/93/126,  $T_1$  12/93/14в), чем в контрольных растениях. Уровень линоленовой кислоты остаётся либо на уровне исходных растений (линия  $T_1$  12/93/14в), либо незначительно уменьшается (линия  $T_1$  12/93/26), либо незначительно увеличивается ( $T_1$  12/93/126).

Количество ненасыщенных жирных кислот в листьях растений коррелирует с их устойчивостью к абиотическим стрессам (холоду, повышенным температурам) [7].

В результате введения гена *sup11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка в растения рапса были получены растения с изменённым соотношением жирных кислот в листьях. В потомстве от самоопыления первичных трансформантов обнаружены линии с незначительно уменьшенным ( $T_1$  12/93/126,  $T_1$  12/93/14в) количеством С18:2, что говорит о снижении их способности противостоять понижению температуры в период вегетации, что может быть актуальным в период развития всходов. В то же время линия  $T_1$  12/93/26 сохраняет способность синтезировать линолеовую кислоту в листьях на уровне растений исходного сорта.

Изучение газ-спектров эфиров жирных кислот, полученных из семян исходного сорта и  $T_1$  поколения трансформантов, показало, что качественный состав жирных кислот всех проанализированных биотехнологических линий не отличается от такового у контрольных растений. В то же время наблюдаются различия в количестве основных жирных кислот рапсового масла как между контрольными и трансформированными растениями, так и между разными трансгенными линиями.

Количество основной кислоты, запасаемой семенами рапса, — олеиновой (С18:1) — варьирует незначительно. У некоторых линий (Вn12/93/1а, Вn12/93/26) доля олеиновой кислоты остаётся на уровне контроля, у линий Вn12/93/14в, Вn12/93/12а она выше, чем у исходного сорта Мария (рис. Б).

Доля пальмитиновой (С16:0) кислоты остаётся либо на уровне контроля, либо повышается (линии (Вn12/93/1а, Вn12/93/26)). Поскольку количество этой кислоты обратно коррелирует с общим количеством масла в семенах [8], то сохранение этого показателя на уровне контрольных растений является позитивным фактором.

Изменения затрагивают и накопление линолевой (С18:2) кислоты, доля которой у линии Вn12/93/14в снижается почти вдвое.

Одновременно наблюдается почти трехкратное снижение доли линоленовой (С18:3) кислоты у четырёх проанализированных линий. Эта кислота, как и линолевая, из-за своей ненасыщенности (три и две двойные связи соответственно) обладает высокой способностью к окислению. Это может приводить к прогорканию семян, порче масла и других продуктов переработки. Для снижения ненасыщенности масел используют их гидрирование, что удорожает конечный продукт. Поэтому уменьшение доли линоленовой кислоты в семенах является желательным признаком, оно может привести к увеличению периода хранения семян и продуктов переработки без ухудшения их качества.

Среди проанализированных линий выделяется генетически модифицированная линия Вп12/93/14в, которая характеризуется увеличением доли олеиновой и уменьшением доли линоленовой кислот в семенах при сохранении других характеристик исходного сорта Мария. Учтывая, что она также обладает устойчивостью к фосфинотрицину [3] (действующему веществу гербицида BASTA [9]), эта линия может послужить материалом для получения сортов рапса, устойчивых к гербицидам на основе фосфинотрицина и с измененным составом масла, которые могут быть использованы как в пищевых целях, так и в качестве сырья для производства биодизеля.

### **Выводы**

Введение гена *суп11А1* цитохрома P450<sub>scс</sub> из митохондрий коры надпочечников быка в ядерный геном растений рапса влияет на количественный состав жирных кислот в листьях и семенах полученных биотехнологических растений. В результате проведенной газовой хроматографии эфиров жирных кислот, выделенных из семян T<sub>1</sub> поколения трансформантов, выявлена перспективная линия Вп12/93/14, которая характеризуется увеличением доли олеиновой (С18:1) и уменьшением доли линоленовой (С18:3) кислот.

*Робота виконувалась в рамках проекту “Отримання генетично змінених рослин рапа з підвищеною продуктивністю, стійкістю до гербіцидів та зміненням складом олії як сировини для виробництва біодизелю” целевої комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”).*

### **Литература**

1. Morant M., Bak S., Muller B. L., le Werck-Reichhart D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation // Current Opinion in Biotechnology. — 2003. — **14**. — P. 151–162.

2. Спивак С.Г., Бердичевець И.Н., Ярмолинский Д.Г., и др. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *СУР11А1* цитохрома P450<sub>scс</sub> // Генетика. — 2009. — **45**, №9. — С. 1217–1224.

3. Сахно Л.А., Моргул Б.В., Кищенко Е.М., Кучук Н.В. Наследование введенных генов *bar* и *суп11А1* цитохрома P450<sub>scс</sub> животного происхождения в T<sub>1</sub> поколении трансформированных линий табака и рапса // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. — Київ: Логос. — 2009. — Т.7. — С. 250–255.

4. Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргул Б.В. Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду БАСТА, що містять ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>scс</sub> //

Фактори експериментальної еволюції організмів.— Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А.— Київ: Логос.— 2009.— Т.7.— С. 245–250.

5. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.

6. *Garces R., Mancha M.* One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // *Analytical Biochemistry*.— 1993.— **211**.— P. 139–143.

7. *Лось Д.А.* Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // *Успехи биологической химии*.— 2001.— Т.41.— С. 163–198.

8. *Schnurbusch T., Mullers C., Becker H.C.* A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content // *Plant Breed.*— 1999.— V.119, №2.— P. 141–144.

9. *Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R. et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* // *The EMBO J.*— 1987.— V.6, N9.— P. 2519–2523.

### Резюме

Введення гена *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка в ядерный геном рапса влияет на количественный состав жирных кислот в листьях и семенах полученных биотехнологических растений. В результате проведенной газовой хроматографии эфиров жирных кислот, выделенных из семян T<sub>1</sub> поколения трансформантов, выявлена перспективная линия Bn12/93/14в, которая характеризуется увеличением доли олеиновой (C18:1) и уменьшением доли линоленовой (C18:3) кислот.

Введення гена *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> з митохондрий коры надниркових залоз бика до ядерного геному ріпака впливає на кількісний склад жирних кислот в листі і насінні отриманих біотехнологічних рослин. В результаті проведеної газової хроматографії ефірів жирних кислот, виділених з насіння T<sub>1</sub> покоління трансформантів, виявлена перспективна лінія Bn12/93/14в, яка характеризується збільшенням частки олеїнової (C18:1) і зменшенням частки ліноленової (C18:3) кислот.

The *суп11А1* gene of cytochrome P450<sub>SCC</sub> from bovine adrenal cortex mitochondria introduction in the nuclear genome of oilseed rape affects the quantitative composition of fatty acids in the leaves and seeds of biotechnological plant obtained. Perspective line Bn12/93/14в, which is characterized by an increase in the proportion of oleic (C18:1) and a decrease in the proportion of linolenic (C18:3) acids revealed as a result of gas chromatography of fatty acids esters isolated from the seeds of T<sub>1</sub> transformant generation.

**СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КРУГЛОВА Н.Н.**

*Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОДОГЕНЕЗА В КАЛЛУСАХ АНДРОКЛИННОГО И ЗАРОДЫШЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Биотехнологические методы культуры *in vitro* в настоящее время широко используются для решения прикладных задач селекции ценных сельскохозяйственных растений [8, 11, 12] и в частности яровой мягкой пшеницы — основного хлебного злака [6].