

СОЗДАНИЕ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *сyp11A1* ЦИТОХРОМА P450_{SCC} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Л. А. Сахно
Б. В. Моргун
Е. Ю. Кваско
Н. В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

E-mail: sakhno2007@ukr.net

В результате экспериментов по агробактериальной трансформации листовых дисков ярового рапса с использованием конструкций, содержащих в качестве целевого ген *сyp11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка, созданы трансгенные растения. Они характеризуются изменениями в накоплении суммарного растворимого протеина в листьях, увеличением антиоксидательной активности тканей листа и сокращением периода вегетативного развития.

Ключевые слова: *Brassica napus*, ген *сyp11A1*, генетическая трансформация, цитохром P450_{SCC}, антиоксидательная активность.

В последние годы возрастает интерес к введению различных генов цитохрома P450 животного происхождения в геном растений. Это связано с возможностью получения растений с новыми ценными характеристиками: устойчивостью к гербицидам и способностью к ремедиации почв и воздуха за счет экспрессии генов, участвующих у млекопитающих в метаболизме ксенобиотиков (*сyp1A1*, *сyp2B6*, *сyp2C19*, *сyp2E1*) [1, 2, 3], а также ускорению темпов роста благодаря синтезу не присущих растительным тканям биологически активных молекул (*сyp11A1*) [4]. Растения риса [1] способны расти на почвах, содержащих атразин и метолахлор, и накапливать их, очищая почву. Картофель с активным геном *сyp1A1*, полученным из печени крысы, демонстрирует устойчивость к гербицидам хлортолуруну и метабензтиазуруну [2]. Тополя, экспрессирующие ген *сyp2E1* цитохрома P450 из печени кролика, способны поглощать такие ядовитые вещества, как трихлорэтилен, винилхлорид, четыреххлористый углерод, хлороформ и бензен [3], благотворно влияя на состояние почв и воздуха.

В экспериментах с табаком было показано, что трансгенные растения, в ядро которых был интегрирован ген *сyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения, опережают контрольные в среднем на две не-

дели по темпам роста и развития [4]. Наблюдаемый фенотипический эффект авторы объясняют влиянием новых биологически активных стероидных веществ, не характерных для растений дикого типа. Сокращение периода вегетации и возможность более раннего сбора урожая экономически целесообразны для сельхозпроизводителей.

Целью работы было создание и анализ растений рапса, несущих в ядерном геноме ген *сyp11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала использовали поддерживаемые в условиях *in vitro* растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) следующих промышленных сортов: Калиновский и Мария селекции Национального аграрного университета НААНУ, Магнат (селекция РУП «Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию»).

Агробактериальная трансформация рапса. Трансформацию рапса проводили согласно методике, разработанной нами ранее [5]. В качестве эксплантов использовали листья 3–4-не-

дельных растений, выращенных в асептических условиях. За 3–4 сут до инфицирования экспланты насекали и помещали для инициации каллуса на поверхность агаризованной среды MS [6], дополненной 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 0,1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л кинетина (Кин). Кроме того, среда содержала 1 г/л тиосульфата натрия в качестве агента, увеличивающего восприимчивость растительных тканей к агробактерии и таким образом повышающего эффективность трансформации [7]. В подготовленной агробактериальной суспензии экспланты нарезали на сегменты размером приблизительно 0,3–0,5×0,3–0,5 см и выдерживали, периодически перемешивая, в течение получаса. Затем, подсушив фильтровальной бумагой, переносили их в те же чашки Петри, где происходило прекультивирование. Сокультивирование продолжалось в течение 2 сут на свету в условиях термальной комнаты [8]. После этого экспланты отмывали от избытка агробактерий, подсушивали и переносили на агаризованную среду для каллусообразования (MS с добавлением 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП и 0,1 мг/л Кин, 5 мг/л тиосульфата серебра), в которую вводили цефотаксим (500 мг/л) для элиминации бактерий. Через 5–7 сут культивирования в условиях термостата (24 °С) их пассировали на среду того же состава, но с добавлением 5 мг/л фосфинотрицина (PPT) в качестве селективного агента. Формирование каллуса при этом продолжалось на рассеянном свету в течение последующих 7–10 дней. Для регенерации использовали среду MS с добавлением 2 мг/л БАП, 1 мг/л Зеа, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НУК и 1 мг/л ГК, 250 мг/л цефотаксима и 5 мг/л PPT. Спустя еще 3 нед сформировавшиеся зеленые побеги пересаживали на безгормональную среду MS, дополненную 5 мг/л PPT, а остальные каллусы пассировали снова на регенерационную среду того же состава. Полученные растения выращивали на безгормональной агаризованной среде MS с 10 мг/л PPT. Формирование корней происходило в этих условиях без дополнительной инициации.

Плазмиды и бактериальный штамм.

В качестве донора гена *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка использовали плазмиду pGBP450f, полученную из Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Бинарный вектор pICH5290 служил реципиентом гена *cyp11A1* и основой для двух генетических конструкций — pCB092 и pCB093 (рис. 1).

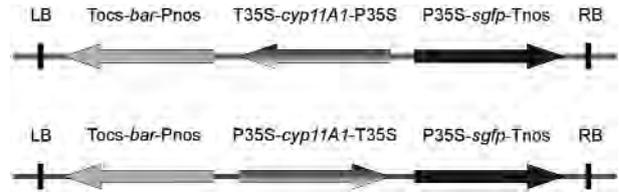


Рис. 1. Схематическая карта генетических конструкций pCB092 (вверху) и pCB093 (внизу). Экспрессирующие кассеты указаны с промоторами (P) и терминаторами (T)

Использовали также компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (Stratagene), а трансформацию осуществляли по общепринятому химическому методу [9]. Для работы с растительными тканями применяли *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101.

Ночную культуру агробактерии наращивали в 20 мл жидкой среды LB [9], дополненной 50 мг/л карбенициллина и 100 мг/л рифампицина, на качалке (180 об/мин) в течение 24 ч при 24 °С в темноте. Затем агробактериальную суспензию разбавляли в 3 раза средой для каллусообразования и инкубировали в тех же условиях в течение 3–4 ч. Полученную суспензию использовали для инфицирования.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для подтверждения введения генов *bar* и *cyp11A1* анализировали тотальную ДНК регенерированных растений с помощью реакций амплификации с праймерами 5'-GGA ATT CAT GAG CGG AGA ATT AAG GGA GT-3' и 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', с которыми синтезируется фрагмент размером 910 п. н. (*bar*), 5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' и 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3', дающими фрагмент размером 502 п. н. (*cyp11A1*) [4]. Для проверки отсутствия агробактериальной ДНК в полученных растительных линиях проводили ПЦР с праймерами на *virD1*. Для амплификации фрагмента этого гена длиной 432 п. н. использовали праймеры *virD1-1*, 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3' и *virD1-2*, 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A-3' [10]. Для реакции брали 200 нг геномной ДНК каждого образца, по 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,2 мкМ смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, 1 единицу Taq-полимеразы в однократном реакционном буфере. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Программа амплификации: денатурация 94 °С, 4 мин; 35 циклов — 56 °С, 1 мин; 72 °С, 20 с; 94 °С, 30 с; заключительный цикл — 10 мин при

72 °С. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» (фирма «ДНК-технология», Москва). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе.

Выделение суммарной РНК. Суммарную РНК выделяли из листьев растений, для которых показано наличие гена *cup11A1*, согласно методике [11]. Для анализа брали 200 мг листьев. Концентрацию РНК измеряли на фотометре BioPhotometer (Erpendorf) v.1.35.

Проведение обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Для проверки экспрессии целевого гена (*cup11A1*) на уровне транскрипции проводили ОТ-ПЦР-анализ с использованием суммарной РНК. Синтез первой цепи кДНК на матрице РНК осуществляли с использованием набора для проведения ОТ-ПЦР «First strand cDNA synthesis kit» (Fermentas) согласно инструкции фирмы-производителя. Для каждой пробы РНК проводили две реакции — с добавлением и без добавления обратной транскриптазы М-MuLV. Амплификацию и анализ ПЦР-продуктов выполняли, как описано выше.

Определение суммарного растворимого протеина (СРП) в листьях рапса. Для анализа количества протеина в листьях растений рапса применяли метод Бредфорда [12]. Измерения проводили на фотометре BioPhotometer (Erpendorf) v.1.35.

Определение антиокислительной активности растений. Антиокислительную активность определяли по методу Семенова, Ярош [13] с некоторыми модификациями. Для этого 0,3 г листьев растирали в ступке с 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4). Полученный гомогенат количественно переносили в пробирки Erpendorf и центрифугировали в микроцентрифуге 10 мин при 4000 об/мин. В кювету для фотоэлектроколориметра толщиной 1 см вносили 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мл 0,8 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, 0,5 мл сульфата железа (II) и 0,5 мл супернатанта (опыт) или 0,5 мл дистиллированной воды (контроль). После этого каждые 30 с в течение 5 мин измеряли оптическую плотность раствора в кювете (D_t) при длине волны 510 нм. Кроме того, определяли оптическую плотность раствора, в который вместо 0,5 мл сульфата железа (II) добавляли 0,5 мл дистиллированной воды (D_∞). В данных условиях 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия полностью окислен. После этого определяли константу скорости окисления 2,6-дихлор-

фенолиндофенолята натрия как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма ΔD_t ($\Delta D_t = D_\infty - D_t$) от времени. За показатель антиокислительной активности растительного материала принимали значение константы ингибирования ($K_{и}$) окисления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, которую вычисляли по формуле:

$$K_{и} = (K_{контр} - K_{опыт})/C,$$

где $K_{контр}$ и $K_{опыт}$ — константы скорости окисления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия в контрольном и опытном варианте соответственно, мл/л·мин; C — концентрация растительного материала в кювете, мг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили, оценивая разность средних (t -критерий Стьюдента) при сравнении количества протеина и антиокислительной активности растительных экстрактов, а также определяя критерий χ^2 при расщеплении в поколениях $T_1 - T_2$ трансформантов согласно [14].

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов по трансформации листовых дисков с использованием двух генетических конструкций получено 46 независимых фосфинотрицинустойчивых линий рапса трех промышленных яровых сортов (8 линий, вектор рСВ092, с использованием сорта Калиновский; 27 и 11 линий, вектор рСВ093, с применением сортов Мария и Магнат, соответственно).

Наличие чужеродных генов и отсутствие бактериального загрязнения у первичных трансформантов было показано с помощью ПЦР (рис. 2, А–В).

Для проверки экспрессии целевого гена (*cup11A1*) на уровне транскрипции проводили ОТ-ПЦР с использованием суммарной РНК. В ходе проведенных анализов было показано, что у части протестированных линий трансгенных растений детектируется наличие фрагмента размером 502 п. н. Это подтверждает прохождение процесса транскрипции генетического гена в этих линиях (рис. 2, Г).

В условиях *in vitro* различий в темпах роста, укоренения, размерах растений исходных и трансформированных линий выявлено не было.

Растения 15 линий первичных трансформантов рапса были перенесены в грунт в условиях теплицы. Они, как и растения исходных сортов, легко адаптировались к условиям закрытого грунта. В теплице био-

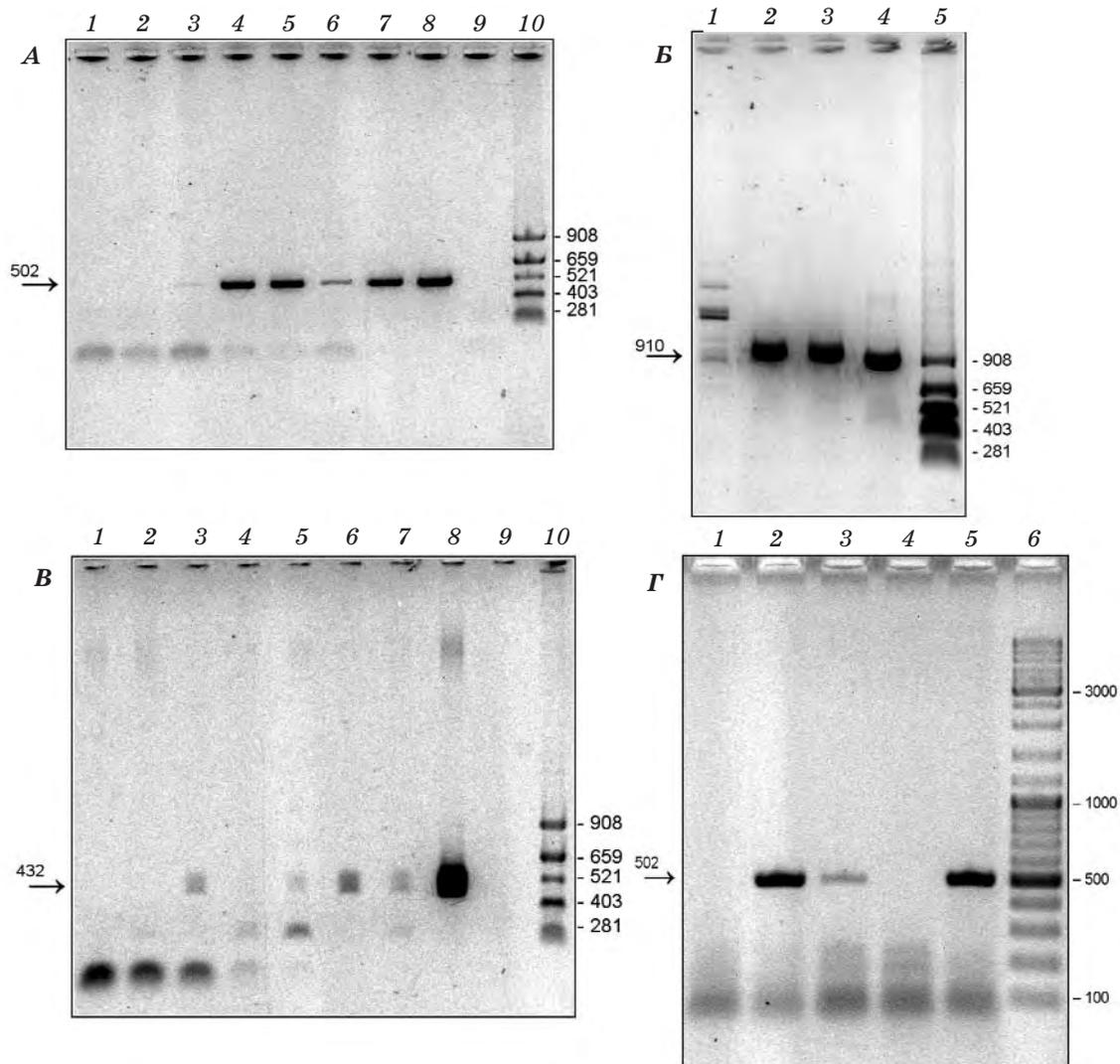


Рис. 2. Молекулярно-биологический анализ первичных трансформантов рапса:

А — гель-электрофорез продуктов ПЦР-амплификации гена *cyp11A1*: 1–7 — линии Bn12/93/13, Bn12/93/17, Bn12/93/4, Bn12/93/1; Bn12/93/12; Bn12/93/11, Bn9/93/3; 8 — ДНК плазмиды pGBP450f, положительный контроль; 9 — отрицательный контроль, без матрицы; 10 — 200 нг ДНК плазмиды pBR322, гидролизованной эндонуклеазой AluI в роли маркера молекулярных масс;

Б — электрофорез продуктов амплификации гена *bar*: 1 — ДНК плазмиды pGBP450f как положительный контроль; 2–4 — линии Bn12/93/2; Bn12/93/11, Bn9/93/3; 5 — 280 нг маркера, ДНК плазмиды pBR322, гидролизованной эндонуклеазой AluI;

В — электрофорез продуктов амплификации гена *virD1*: 1–7 — линии Bn12/93/1; Bn12/93/12; Bn12/93/4, Bn12/93/11, Bn12/93/13, Bn12/93/17, Bn5/92/8; 8 — геномная ДНК агробактерии GV3101, положительный контроль; 9 — отрицательный контроль, без матрицы; 10 — 200 нг ДНК плазмиды pBR322, гидролизованной эндонуклеазой AluI в роли маркера молекулярных масс;

Г — ОТ-ПЦР с добавлением ревертазы: 1 — Bn 12 (отрицательный контроль), 2–4 — линии Bn12/93/12, Bn9/93/3, Bn5/92/2, 5 — положительный контроль, 6 — маркер молекулярных масс

технологические и исходные линии не отличались по величине листовых пластинок и габитусу (рис. 3, А).

Цветение трансформированных линий наступало на 5–7 сут раньше, чем у контрольных растений.

Нарушений в строении генеративных органов выявлено не было. Подобные резуль-

таты были получены в наших предыдущих экспериментах [15] и работах Радчук и др. [16], Cardoza, Stewart [17], Wang et al. [18], Wang et al. [19]. Иногда у первичных трансформантов наблюдается явление гетеростилии, приводящее к практически полной [20] или частичной стерильности растений [21].

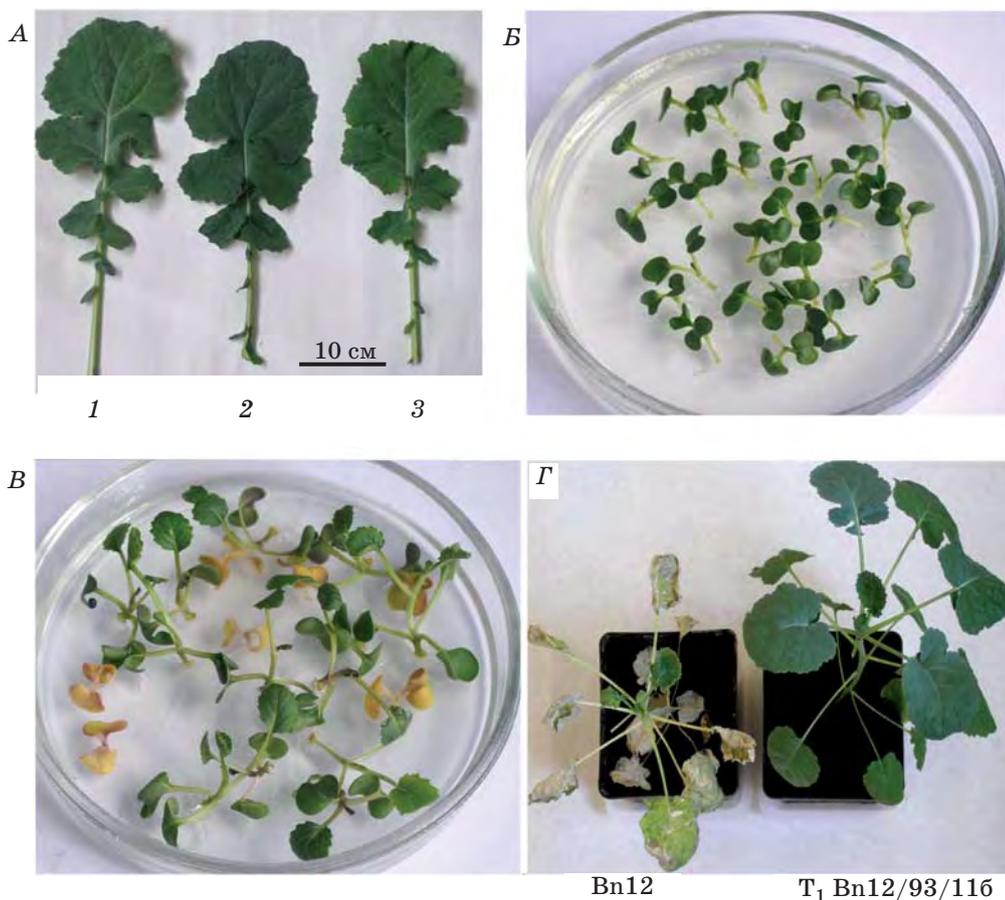


Рис. 3. Фенотипическая характеристика трансформированных линий рапса:

А — листовые пластинки 6-недельных растений рапса, выращенных в теплице: 1 — Bn12/93/11, 3 — Bn12/93/2 — первичные трансформанты, Bn12 — контрольная линия, сорт Мария;
 Б — 5-дневные проростки T₁ Bn12/93/11 на среде без фосфинотрицина;
 В — 14-дневные проростки T₁ Bn12/93/11 на среде с PPT (10 мг/л);
 Г — тестирование на устойчивость к обработке гербицидом BASTA (10 мг/л фосфинотрицина) в условиях теплицы, 3-и сут после опрыскивания: Bn12 — контрольная линия, сорт Мария, T₁ Bn12/93/116 — отобранная в селективных условиях *in vitro* трансгенная линия

В результате самоопыления трансгенных линий получены жизнеспособные семена. Проростки T₁ анализировали *in vitro* на устойчивость к фосфинотрицину (рис. 3, Б — В; таблица). У отобранных линий, растущих в присутствии 10 мг/л PPT *in vitro*, показано наличие введенных генов *bar* и *cyp11A1* с помощью ПЦР (результаты не представлены).

Анализируя наследование гена *bar* в поколении T₂ трансформантов, выделили гомозиготные по этому гену линии Bn12/93/1а, Bn12/93/2в, Bn12/93/14в, Bn12/93/12в, Bn12/93/12а. Для них было характерным расщепление 3:1 по признаку устойчивости к фосфинотрицину, определяемому экспрессией гена *bar*, в поколении T₁ (таблица), и отсутствие расщепления во втором поколении от самоопыления.

Анализ суммарного растворимого протеина (СРП) показал, что наблюдаются различия в накоплении СРП как между исходными и трансформированными растениями, так и между различными биотехнологическими линиями (рис. 4). Подобный эффект от введения гена *cyp11A1* в ядерный геном табака описан в работе [4].

В листьях двух из шести проанализированных трансгенных линий рапса накопление протеина существенно увеличивается по сравнению с исходным сортом (на 38% и 74%, линии Bn12/93/12в и Bn12/93/1а, соответственно). Для остальных превышение СРП над контролем достигает 3–15% (рис. 4). Наблюдаемые различия могут зависеть от уровня экспрессии трансгена, на который влияет ряд факторов, например, количество

Характеристика поколений T₁ і T₂ трансформантов рапса (сорт Марія, вектор рСВ093)

Линия	Всхожесть семян <i>in vitro</i> , %	Количество растений, шт.		Расщепление	χ ² *
		РРТ ⁺	РРТ ⁻		
T ₁ Bn12/93/1	99	73	26	3:1	0,08
T ₁ Bn12/93/2	96	73	23	3:1	0,05
T ₁ Bn12/93/11	94	94	–	отсутствует	–
T ₁ Bn12/93/12	98	72	26	3:1	0,11
T ₁ Bn12/93/14	90	68	22	3:1	0,01
T ₂ Bn12/93/1a	100	100	–	отсутствует	–
T ₂ Bn12/93/2a	95	70	25	3:1	0,08
T ₂ Bn12/93/2б	96	68	28	3:1	0,91
T ₂ Bn12/93/2в	98	98	–	отсутствует	–
T ₂ Bn12/93/12a	100	100	–	отсутствует	–
T ₂ Bn12/93/12б	98	70	28	3:1	0,61
T ₂ Bn12/93/12в	99	99	–	отсутствует	–
T ₂ Bn12/93/14a	97	68	29	3:1	1,11
T ₂ Bn12/93/14б	97	71	26	3:1	0,08
T ₂ Bn12/93/14в	98	98	–	отсутствует	–
Bn12 (контроль)	96	–	96	отсутствует	–

* χ²_{st} = 3,84.

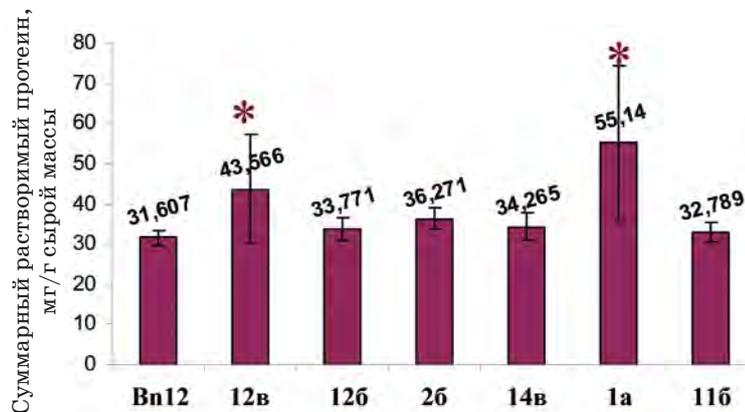


Рис. 4. Анализ суммарного растворимого протеина в листьях рапса:

Bn12 — (контроль, сорт Марія), трансгенные линии T₁ поколения: Bn12/93/12в, Bn12/93/12б, Bn12/93/2б, Bn12/93/14в, Bn12/93/1a, Bn12/93/11б.

* Различия достоверны при P ≤ 0,05

копий введенного гена, место его встраивания, уровень метилирования и др. Увеличение СРП в листьях трансформированных линий рапса коррелирует с результатами ОТ–ПЦР (рис. 2, Г).

Рапс можно успешно выращивать для производства кормов (зеленая масса, силос, сенаж, травяная мука) в основных, промежуточных и поукосных посевах, в чистом виде и в смеси с другими культурами [22].

На посевах рапса выпасают скот, поскольку эта культура имеет способность интенсивно отрастать после стравливания или скашивания.

По биохимическим характеристикам рапс превосходит многие кормовые культуры. В 1 кг зеленой массы обычно содержится 30 г легкоусваиваемого протеина, большое количество аскорбиновой кислоты (505–1070 мг/кг для озимого и 515–786 мг/кг для ярового) и каротина (19,4–42,9 мг/кг для озимого и 20,6–37,4 мг/кг для ярового) [22, 23]. Увеличение количества протеина повышает пищевую ценность этой культуры и может расцениваться как позитивное изменение. Кроме того, повышенное содержание протеина благоприятно для обогащения почвы азотом при выращивании рапса в качестве сидератной культуры.

Определение константы ингибирования (K_{in}) реакции окисления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия экстрактами листьев растений T_1 -поколения трансформантов, выращиваемых в условиях теплицы, показало, что их антиокислительная активность является выше таковой исходных растений (рис. 5).

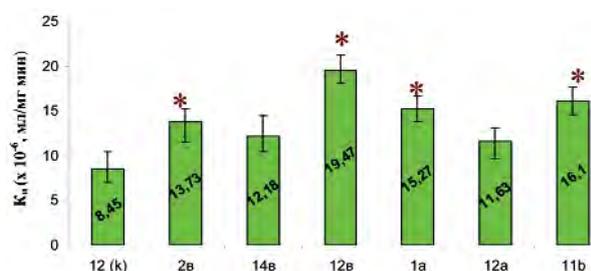


Рис. 5. Антиокислительная активность в тканях листьев исходных (12(к), сорт Мария) и биотехнологических (Bn12/93/2в, Bn12/93/14в, Bn12/93/12в, Bn12/93/1а, Bn 12/93/12а, Bn 12/93/11б) линий рапса

В растениях рапса, полученных в ходе данной работы, наблюдается повышение антиокислительной активности тканей листа на 38–130% по сравнению с контрольной линией (рис. 5). Листья рапса трансгенной линии Bn12/93/12в (первое поколение) имели антиокислительную активность, которая в 2,3 раза превышает таковую у исходного сорта Мария. Для этой линии характерно и увеличение накопления суммарного растворимого протеина в листьях.

Однако для большинства проанализированных линий не отмечено корреляции между количеством СРП и изменениями в антиокислительной активности. Возмож-

но, они связаны с повышенным синтезом низкомолекулярных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и каротин, либо с усилением активности ферментов антиоксидантной системы [24].

По данным Chen et al. [25], листья рапса обладают антиоксидантной активностью, превышающей таковую у многих традиционно выращиваемых растений. В пересчете на аскорбиновую кислоту она составила 710 мкг/г сырой массы. В листьях салата и шпината этот показатель был ниже (446 и 434 мкг/г, соответственно), в листьях краснокочанной капусты — выше почти в два раза (1217 мкг/г).

Трансгенные растения рапса с увеличенной до четырех раз антиокислительной активностью за счет экспрессии регуляторного гена арабидопсиса *AtPAP1* (*Production of Anthocyanin Pigment 1*) созданы Li et al. [26]. Характерным для них было пятикратное повышение содержания кверцетина и синаповой кислоты в листьях, а уровень цианидина и пеларгонина возрастал в 50 раз. Листья полученных растений имели разную степень выраженности фиолетово-зеленой окраски.

Антиоксиданты защищают клеточные структуры растений от повреждения их свободными радикалами [24]. Основные природные антиоксиданты — витамины Е и С, ненасыщенные жирные кислоты, полифенолы, антоцианы, флавоноиды, ароматические окислительные кислоты. Повышение антиоксидантной активности в тканях растений позитивно влияет на их возможность противостоять стрессовым факторам различного происхождения [27, 28, 29].

Созданные в результате проведенных экспериментов линии Bn12/93/2в, Bn12/93/12в, Bn12/93/1а, Bn12/93/11б перспективны для изучения их устойчивости к повышенным температурам и засухе. Это актуально для рапса в климатических условиях Украины, поскольку повышение температуры в период созревания семян ведет к снижению их масличности [22]. Кроме того, указанные линии могут обладать повышенной устойчивостью к грибным патогенам [30, 31].

Использование полученных растений с повышенной антиокислительной активностью в качестве добавок к корму животных могло бы оказывать профилактическое воздействие на их организм, повышая сопротивляемость к различным инфекциям.

В результате экспериментов по агробактериальной трансформации листовых дисков ярового рапса с использованием конструк-

ций, що містять в якості цільового гену *cyp11A1* цитохрому P450_{SCC} із мітохондрій кори надпочечників бика, створені трансгенні рослини, що характеризуються змінами в накопленні суммарного розчинного протеїну в листках, збільшенням антиокислювальної активності тканин листа і скороченням на 7 днів періоду вегетативного розвитку. Отримані лінії можуть бути використані в якості вихідного матеріалу в селекції ярового рапса, сировини для виробництва біодизеля і для отримання харчового масла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kawahigashi H., Hirose S., Ohkawa H., Ohkawa Y. Transgenic rice plants expressing human P450 genes involved in xenobiotic metabolism for phytoremediation // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 15, N 2–3. — P. 212–219.
2. Yamada T., Ohashi Y., Ohsima M. et al. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the *cyp11A1* gene // Theor. Appl. Genet. — 2002. — V. 104. — P. 308–314.
3. Doty S. L., James C. A., Moore A. L. et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — V. 104, N 43. — P. 16816–16821.
4. Спивак С. Г., Бердичевец І. Н., Ярмолинський Д. Г. і др. Створення і характеристика трансгенних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* L., експресуючих кДНК *CYP11A1* цитохрому P450_{SCC} // Генетика. — 2009. — Т. 45, № 9. — С. 1217–1224.
5. Пат. 39205 UA 51 МПК А01Н1/00; А01Н4/00; А01Н5/00; С12Н1/00; С12Н5/00; С12Н15/00. Спосіб отримання трансформованих рослин рапаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є. А., Сахно Л. О., Кучук М. В. — Заявл. 03.10.2008; Опубл. 10.02.2009; Бюл. № 3.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
7. Olhoft P. M., Lin K., Galbraith J. et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // Plant Cell. Rep. — 2001. — V. 20. — P. 731–737.
8. Zambre M., Terryn N., De Clercq J. et al. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells // Planta. — 2003. — V. 216. — P. 580–586.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989. — 1500 p.
10. Joao K. H. L., Bown T. A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 Rif^r:: pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // Plant Cell. Rep. — 1993. — V. 12. — P. 422–425.
11. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Anal. Biochem. — 1987. — V. 163. — P. 16–20.
12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Ibid. — 1976. — V. 72, N 2. — P. 248–254.
13. Семенов В. Л., Ярош А. М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 3. — С. 50–52.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.
15. Сахно Л. А., Гочева Е. А., Комарницький І. К., Кучук М. В. Стабільна експресія безпромоторного гена *bar* в трансформованих рослинах рапса // Цитологія і генетика. — 2008. — Т. 42, № 1. — С. 21–28.
16. Радчук В. В., Клоке Э., Радчук Р. И. и др. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 7. — С. 932–941.
17. Cardoza V., Stewart C. N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants // Plant Cell. Rep. — 2003. — V. 21. — P. 599–604.
18. Wang W. C., Menon G., Hansen G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants // Ibid. — 2003. — V. 22. — P. 274–281.
19. Wang Y., Nowak G., Culley D. et al. Constitutive expression of pea defence gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola

- (*Brassica napus*) // Mol. Plant Microbe Interact. — 1999. — V. 12. — P. 410–418.
20. Ралдугина Г. Н., Горелова С. В., Кожемякин А. В. Стабильность и наследование трансгенов в растениях рапса // Физиол. раст. — 2000. — Т. 47, № 3. — С. 437–445.
21. Cheon B. Y., Kim H. J., Oh K. H. et al. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis* // Transg. Res. — 2004. — V. 13. — P. 541–549.
22. Гольцов А. А., Ковальчук А. М., Абрамов В. Ф., Милащенко Н. З. Рапс, сурепица. — М.: Колос, 1983. — 192 с.
23. Вехов В. Н., Губанов И. А., Лебедева Г. Ф. Культурные растения СССР. — М.: Мысль, 1978. — 336 с.
24. Максимов И. В., Черепанова Е. А. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Усп. совр. биол. — 2006. — Т. 126, № 3. — С. 250–261.
25. Chen I.-C., Chang H.-C., Yang H.-W., Chen G.-L. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and chinese herbs: a fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates // J. Food. Drug. Anal. — 2004. — V. 12, N 1. — P. 29–33.
26. Li X., Gao M.-J., Pan H.-Yu. et al. Purple canola: *Arabidopsis PAP1* increases antioxidants and phenolics in *Brassica napus* leaves // J. Agric. Food Chem. — 2010. — V. 58, N 3. — P. 1639–1645.
27. Kim Y.-H., Lim S., Yang K.-S. Expression of *Arabidopsis* NDPK2 increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweet potato plants // Mol. Breeding. — 2009. — V. 24. — P. 233–244.
28. Yang L., Tang R., Zhu J. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing *AtIpk2b*, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. — 2008. — V. 66. — P. 329–343.
29. Gusta L. V., Benning N. T., Wu G. et al. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // Mol. Breeding. — 2009. — V. 24. — P. 103–115.
30. Dong X., Ji R., Guo X. et al. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*) // Planta. — 2008. — V. 228, N. 2. — P. 331–340.
31. Васюкова Н. И., Зиновьева С. В., Удалова Ж. В. и др. Жасмоновая кислота и устойчивость томатов к галловой нематоде // Докл. РАН. — 2009. — Т. 428, № 3. — С. 420–422.

СТВОРЕННЯ ТРАНСФОРМОВАНИХ РОСЛИН РІПАКУ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *CYP11A1* ЦИТОХРОМУ P450_{SCC} ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Л. О. Сахно, Б. В. Моргун,
О. Ю. Кваско, М. В. Кучук

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: sakhno2007@ukr.net

У результаті експериментів з агробактеріальної трансформації листкових дисків ярого ріпаку з використанням конструкцій, що мають у своєму складі як цільовий ген *cyp11A1* цитохрому P450_{SCC} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, створено трансгенні рослини. Вони характеризуються змінами в накопиченні сумарного розчинного протеїну в листі, підвищенням антиокиснювальної активності тканин листка і скороченням періоду вегетативного розвитку.

Ключові слова: *Brassica napus*, ген *cyp11A1*, генетична трансформація, цитохром P450_{SCC}, антиокиснювальна активність.

CREATION OF TRANSFORMED RAPE PLANTS THAT EXPRESS *CYP11A1* CYTOCHROME P450 GENE OF ANIMAL ORIGIN

L. O. Sakhno, B. V. Morgun,
O. Yu. Kvasko, M. V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: sakhno2007@ukr.net

The transgenic rape plants were obtained as a result of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf disks with gene constructs carrying *cyp11A1* cytochrome P450_{SCC} gene from bovine adrenal cortex mitochondria.

They are characterized by changes in the accumulation of total soluble protein, increase of antioxidant activity, and reduction of vegetative development period.

Key words: *Brassica napus*, *cyp11A1* gene, genetic transformation, cytochrome P450_{SCC}, antioxidant activity.