

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ЯРОВОГО РАПСА, НЕСУЩИЕ В СВОЕМ ГЕНОМЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ ГЕНЫ ЖИВОТНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ШИШЛОВА-СОКОЛОВСКАЯ Анастасия Михайловна, научный сотрудник
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Экспрессия в растениях гетерологичных генов млекопитающих, которые кодируют белки, выполняющие важные регуляторные функции в клетках животных, представляет интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. К числу таких белков относятся цитохромы P450. Японскими учеными было показано, что встраивание генов *sup1A1*, *sup2B6*, *sup2C19* цитохрома P450 человека в геном риса и картофеля приводит у трансгенных растений к устойчивости к гербициду и способности к фиторемедиации [1]. Экспрессия гена *sup1A1* из печени крысы в растительном геноме вызывает устойчивости к гербицидам, синтезированным на основе мочевины и фенилмочевины [2]. Также созданы трансгенные растения тополя с геном *sup2E1* кроличьего цитохрома P450 устойчивые к трихлорэтилену, хлороформу, четыреххлористому углероду и обладающие фиторемедиацией окружающей среды [3].

В нашей работе мы использовали митохондриальный ген из коры надпочечников быка *sup11A1*, кодирующий цитохром P450_{scc}. Цитохром P450_{scc} является ключевым ферментом стероидогенеза в тканях животных и осуществляет реакцию отщепления боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон [4]. Основные стадии метаболизма стероидных гормонов животных и брассиностероидов растений имеют сходство [5]. В экспериментах по трансформации растений табака геном *sup11A1* показано его влияние на рост, развитие и физиолого-биохимические характеристики растений [6].

В этой связи представляют большой интерес трансгенные растения с геном *sup11A1* цитохрома P450_{scc}, созданные на основе культур, имеющих хозяйственную ценность, таких как яровой рапс (*Brassica napus var. olerifera* D.C.).

Исходным материалом для создания трансгенных растений служил сорт ярового рапса Магнат белорусской селекции. Трансгенные растения рапса была получены в результате *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с использованием вектора pCB093, несущего два гена: кДНК гена

sup11A1 и ген *bar* [7]. Интеграцию и транскрипционную активность трансгенов в реципиентном геноме детектировали в T₀-T₃ поколениях методами ПЦР и ОТ-ПЦР, согласно ранее описанным методикам [8].

Для изучения влияния гена *sup11A1* на рост и развитие трансгенных растений рапса, обладающих в T₁-T₃ поколениях устойчивостью к гербициду, нами был выбран ряд признаков: высота растения, длина и количество боковых побегов главной кисти, а также элементы структуры урожайности - масса 1000 семян, количество стручков на главной кисти.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием вариационного анализа, для определения достоверности различий был применен двухвыборочный t-критерий Стьюдента. Для оценки связи между изучаемыми фенотипическими признаками применялся корреляционный анализ.

В результате трехлетних исследований нами было получено 525 растений ярового рапса 8 трансгенных линий T₀-T₃ поколений, несущие в своем геноме к-ДНК гена *sup11A1* цитохрома P450_{scs} и ген *bar*.

Методами ПЦР- и ОТ-ПЦР анализа подтверждена инсерция и транскрипция кДНК ген *sup11A1* цитохрома P450_{scs} геноме в трансгенных растениях. Показана вставка и экспрессия гена *bar* в трансгенных растениях T₀, T₁, T₂, T₃ поколений при обработке промышленной концентрацией глюфосината аммония.

Посредством биометрического анализа, включающего статистическую обработку ряда морфологических признаков и элементов продуктивности впервые показано влияние кДНК митохондриального гена *sup11A1* цитохрома P450_{scs} быка на растительный геном, а именно, показано стабильное увеличение массы 1000 семян в T₁-T₃ поколениях, а также показателей главной кисти (длины, количества стручков и боковых побегов). Анализ коэффициентов вариации за три года (T₁-T₃ поколения) выявил, что наиболее константными и наименее изменчивыми признаками являются высота растения и масса 1000 семян. Корреляционный анализ зависимости массы 1000 семян от остальных элементов продуктивности показал тесную положительную корреляцию: 0,3<r>0,86 для T₁ поколения, 0,4<r>0,52 для T₂ поколения, 0,4<r>0,7 для T₃ поколения. Максимальными значениями коэффициентов корреляции в поколениях по большинству признаков обладала линия Vn9/93/21. Кроме этого данная линия обладала максимальными значениями как признаков архитектоники, так и элементов структуры урожайности в различных поколениях, что может быть связано с влиянием транскрипционной активности гетерологичных генов *sup11A1* цитохрома P450_{scs}, *bar* на геном рапса.

Список использованных источников

1. Inui, H. Metabolism of herbicides and other chemicals in human cytochrome P450 species and in transgenic potato plants co-expressing human *CYP1A1*, *CYP2B6* and *CYP2C19* / H. Inui, N. Shiota, Y. Motoi, Y. Ido, T. Inoue, T. Komada, H. Ohkawa // J Pestic Sci. – 2001b. – 26. – P. 28-40.
2. Yamada, T. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the rat *CYP1A1* gene / Y. Yamada, Y. Ohashi, M. Ohsima, H. Inui, N. Shiota, H. Ohkawa, Y. Ohkawa // Theor. Appl. Genet. – 2002. – 104, N 2. – P. 308-314.
3. Doty, S.L. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees / S.L. Doty, C.A. James, A. Moore A. L. Vajzovic, GL Singleton, Ma C, Z Khan, G Xin, JW Kang, JY Park, R Meilan, SH Strauss, J Wilkerson, F Farin, SE. Strand // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. – 2007. – 104, N 43. – P. 16816-16821.
4. Miller, WL. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorder / WL. Miller, RJ. Auchus // Endocr Rev. – 2011. – 32, N 4. – P. 579.
5. Спивак, С.Г. Создание и характеристика трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum L.*), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} / И.Н. Бердичивец, Д.Г. Ярмолинский, Т.В. Манешина, Г.В. Шпаковский, Н.А. Картель // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.
6. Введение кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} животного происхождения в растения рапса / А.М. Шишлова, Н.А. Картель, Л.А. Сахно, Б.В. Моргунов, Н.В. Кучук // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – Мн., 2010. – Т.11. – С. 12-19.
7. Шишлова-Соколовская, А.М. Получение трансгенных растений ярового рапса (*Brassica napus var. L. olifera, DC*), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{scs} животного происхождения / А.М. Шишлова-Соколовская, Н.В. Кучук, М.П. Шишлов, Н.А. Картель // Весці НАНБ сер. біял. навук. – 2011. – Т.1. – С. 27-33.