

УДК 575.827:604.6:582.683.2

ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН СУР11А1 ЦИТОХРОМА P450_{SCC} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Л.А. САХНО

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
 Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148
 e-mail: sakhno2007@ukr.net

Исследовано влияние температур +8 °С и +26 °С на прорастание семян ярового рапса сорта Мария и полученных на его основе трансгенных линий, экспрессирующих ген сур11А1 цитохрома P450_{SCC} митохондрий коры надпочечников быка. Показано, что при температуре +8 °С практически отсутствует прорастание семян рапса как исходного сорта, так и биотехнологических линий. При повышенной (+26 °С) температуре проростки двух из четырёх трансформированных линий наращивают большую по сравнению с контрольными биомассу, у них активнее работает один из ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутаза. Эти линии перспективны для дальнейшего исследования при создании на их основе линий рапса, устойчивых к повышенным температурам.

Ключевые слова: *Brassica napus*, сур11А1, P450_{SCC}, рапс, проростки, супероксиддисмутаза.

Введение. Изучение влияния введения различных генов цитохрома P450_{SCC} животного происхождения в геном растений вызывает большой интерес в связи с возможностью получения растений с новыми ценными характеристиками: устойчивостью к гербицидам и способностью к фитоочистке почв и воздуха за счёт экспрессии генов, участвующих у млекопитающих в метаболизме ксенобиотиков (сур1А1, сур2В6, сур2С19, сур2Е1) [1–3], а также ускорению темпов роста и развития благодаря синтезу не присущих растительным тканям биологически активных молекул (сур11А1) [4]. Растения риса [1] были способны расти на почвах, содержащих атразин и метолахлор, и накапливать их, очищая почву. Картофель с активным геном сур1А1, полученным из печени крысы, обладал устойчивостью к гербицидам хлортолуруну и метабензтиазуруну [2]. Растения тополя, в которых экспрессировался ген сур2Е1 цитохрома P450 из печени кролика, способны поглощать такие ядовитые вещества, как трихлорэтилен, винилхлорид, четыреххлористый углерод, хлороформ и бензол [3], благотворно влияя на состояние почв и воздуха.

Растения табака *Nicotiana tabacum* св. Petit Havana SR1, в ядро которых был интегрирован ген сур11А1 цитохрома P450_{SCC} животного происхождения, опережали контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития, характеризовались увеличением количеств растворимого белка, растворимых и нерастворимых углеводов, возрастанием биомассы [4]. Цитохромы P450 – монооксигеназы – это белки, вовлечённые в процессы биосинтеза регулятор-

© Л.А. САХНО, 2011

ных соединений, в том числе стероидных гормонов [5]. Накоплены данные о сходстве строения электрон-транспортной цепи митохондрий животных и растений. Так, синтез биотина в растениях происходит с участием белков-гомологов аденодоксина и аденодоксинредуктазы животных [6]. Ферредоксин и ферредоксинредуктаза растений рассматриваются как функциональные гомологи вышеназванных белков животных [7]. В полученных трансгенных растениях табака, экспрессировавших ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} митохондрий коры надпочечников быка, происходили изменения стероидогенеза: синтезировались прегненолон и прогестерон [4]. Это, по мнению авторов, и объясняет физиологические изменения, характерные для этих растений.

Нами были созданы трансгенные линии рапса, содержащие в своём ядерном геноме ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [8]. Все биотехнологические линии были устойчивы к обработке гербицидом BASTA в условиях теплицы за счёт экспрессии гена *bar*. Некоторые трансформанты (линии Vn12/93/1a, Vn12/93/2в и Vn12/93/11) имели повышенное количество суммарного растворимого белка в листьях и семенах. Они характеризовались увеличенной по сравнению с контрольной линией антиокислительной активностью тканей листа. Выявленные изменения в составе жирных кислот листьев и семян этих растений [9] позволили предположить изменения их реакции на воздействие различных температур, в частности на стадии прорастания семян.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве анализируемого материала использовали семена (T_2), полученные в результате самоопыления четырёх трансгенных линий ярового рапса в условиях теплицы.

Исследовали прорастание семян при температурах +8 °С и +26 °С. В течение четырёх суток оценивали такие параметры, как всхожесть, масса проростков, длина hypocotилей и корней, количество суммарного растворимого белка, активность фермента супероксиддисмутазы (СОД). Для проращивания 50 семян каждой линии помещали в чашку Петри на увлажнённую (5 мл дистиллированной воды) фильтровальную бумагу и помещали в термостат. Проводили три независимых эксперимента.

Определение суммарного растворимого белка выполняли по методу Bradford [10].

Определение активности СОД проводили с использованием метода фотохимического окисления нитроглубого тетразолия согласно [11]. Обработанный жидким азотом растительный материал (100 мг) помещали в пробирку Eppendorf (1,5 мл), растирали с 1 мл Tris-HCl буфера (pH 8,0) и центрифугировали при 13000 g (4 °С) в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали для анализа. Реакцию с нитроглубым тетразолием проводили в пробирках Eppendorf (1,5 мл). Одну пробирку для каждого образца оставляли в темноте, другую освещали в течение 5 мин в термостате при 26 °С лампой белого света (люминесцентная лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W). Оптическую плотность при 550 нм определяли в реакционной смеси, выдержанной на свету, против оптической плотности пробы, выдержанной в темноте, на фотометре BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Нулевая проба не содержала растительного экстракта. Расчёт проводили по формуле:

$$\text{СОД (отн. ед./мл сусп.)} = (\text{ОД}_1/\text{ОД}_2 - 1) [\text{ФР}],$$
где ОД_1 – оптическая плотность нулевой пробы; ОД_2 – оптическая плотность экспериментальной пробы; ФР – фактор разведения = объём реакционной смеси,

мл/ объём используемого растительного экстракта, мл. Активность СОД выражали в отн. ед. акт./ мг белка.

Статистическая обработка результатов проводилась оценкой разности средних (*t*-критерий Стьюдента) при сравнении массы проростков, длины гипокотилей и корней согласно [12].

Результаты и обсуждение

Прорастание семян при температуре +8 °С было затруднено как у контрольной, так и у экспериментальных линий. Первые трое суток проходило набухание семян, на четвёртые сутки наблюдали их проклёвывание, появлялись корешки (~ у 60 % семян) и единичные проростки.

У трансформированных растений рапса, экспрессировавших митохондриальную *Mn* СОД пшеницы (*Mn SOD3.1*), наблюдали прорастание и различия в прорастании между контрольной и трансгенными линиями при + 8 °С [13]. Линия 14–1, у которой активность СОД на 20 % превышала активность у контрольной линии, прорастала на 30 % эффективнее. Всхожесть семян дигиплоидной линии DH–12075, взятой для трансформации в этих экспериментах [13], на третьи сутки при +8 °С составляла 60%. Всхожесть семян исходного для наших опытов по трансформации рапса сорта Мария на четвёр-

тые сутки при +8 °С составила 1%. Следовательно, разная способность к прорастанию трансгенных линий с активными гетерологичными генами *Mn SOD3.1* и *sup11A1* определяется особенностями выбранного для трансформации исходного материала.

При температуре +26 °С уже на первые сутки наблюдали 100% проклёвывание семян во всех анализируемых линиях.

Масса проростков увеличивалась на четвёртые сутки до десяти раз по сравнению с массой семян (рис. 1, А). Уже на вторые сутки проращивания проявились различия в накоплении биомассы проростками контрольной и трансгенных линий. Проростки линий Vn12/93/14в и Vn12/93/12в развивались так же, как и контрольные. Превышение массы проростков линий Vn12/93/1а и Vn12/93/2в над контрольными составило на вторые сутки 25% (Vn12/93/1а) и 63% (Vn12/93/2в), на третьи – 48% для обеих линий. К четвертым суткам проращивания темпы роста данных трансгенных линий замедлились, однако масса проростков оставалась выше контрольных в 1,25 раза. Таким образом, при повышенной (+26 °С) температуре наблюдались различия в накоплении биомассы как между проростками конт-

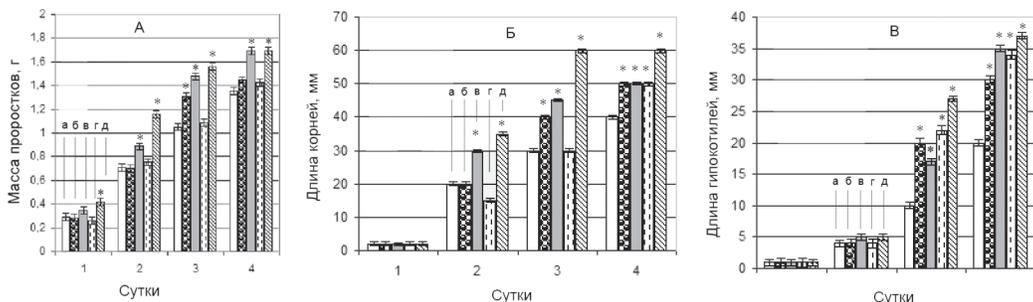


Рис. 1. Динамика изменения массы (А), длины корней (Б) и длины гипокотилей (В) контрольных и трансгенных проростков: а – Vn 12 (к), контроль; б, в, г, д – биотехнологические линии T2 12в, T2 1а, T2 14в, T2 2в; * – различия достоверны при P<0,05

рольной и трансгенных, так и между проростками трансформированных линий.

Интересно отметить, что увеличение биомассы наблюдали и у трансформированных растений рапса, экспрессировавших Mn SOD3.1 [13], и у трансгенных растений клевера с введённым геном Mn супероксиддисмутазы, конечный продукт которого накапливался либо в митохондриях, либо в хлоропластах благодаря особенностям векторных конструкций [14, 15], и у трансформантов табака [4] и картофеля [16] с геном *сур11А1* цитохрома P450_{SCC}.

Анализ увеличения длины корней проростков показал, что на первые сутки прорастивания различий не наблюдалось (рис. 1, Б). На вторые сутки длина корней контрольных растений и линии Vn12/93/12 составила 20 ± 2 мм, у линий Vn12/93/2в и Vn12/93/1а корни были длиннее по сравнению с контрольными в 1,5 и 1,75 раза соответственно. Тенденция к формированию более длинных корней у трансгенных проростков по сравнению с контрольными сохранялась до конца эксперимента. На четвёртые сутки длина корней у трёх биотехнологических линий (Vn12/93/14, Vn12/93/12в и Vn12/93/1а) была выше, чем у контрольных проростков, на 25%. У линии Vn12/93/2в превышение составило 50%. Увеличение длины корней свидетельствует о лучшей приспособляемости проростков трансформированных линий к условиям повышенных температур.

Анализ динамики изменений длины гипокотилей у анализируемых проростков показал, что различия проявлялись на третьей сутки прорастивания (рис. 1, В). Трансгенные проростки формировали гипокотили, которые в 1,7 – 2,7 раза длиннее, чем у контрольных растений. У 4-дневных проростков как биотехнологических, так и контрольной линий темпы роста гипокотилей замедлялись. Однако гипокотили у

трансгенных линий были на 25 – 85% длиннее, чем у проростков контрольной линии. Максимальным увеличением длины гипокотилей на четвёртые сутки прорастивания характеризовалась линия Vn12/93/2в.

Таким образом, по физиологическим характеристикам линии Vn12/93/12в и Vn12/93/14в были близки к исходному сорту, а линии Vn12/93/1а и Vn12/93/2в значительно превосходили контрольные по массе проростков, длине корней и гипокотилей.

Количество суммарного растворимого белка (СРБ) в проростках по мере прорастания уменьшалось (рис. 2, А). К концу эксперимента уровень СРБ в проростках контрольной линии был наполовину меньше, чем в проростках линии Vn12/93/2в. Аналогичные результаты получены при анализе прорастания семян двух разновидностей редиса и рапса [17], а также гороха [18].

Активность супероксиддисмутазы возрастала во всех образцах по мере прорастания семян при +26 °С (рис.2, Б); при +8 °С ее не анализировали из-за практического отсутствия прорастания при данной температуре.

Увеличение активности СОД показано при прорастании семян гороха [18] и созревании его семян [19]. Активность СОД в проростках линий Vn12/93/1а и Vn12/93/2в по сравнению с контрольными была выше до 30 % на протяжении всего эксперимента. Эти линии характеризовались и наибольшим приростом биомассы, длины корней и гипокотилей при повышенной (+26 °С) температуре. Поэтому их можно считать перспективными для дальнейшего изучения и использования как линий с повышенной устойчивостью к повреждающему действию высоких температур.

Экспрессировавшие Mn SOD3.1 пшеницы растения рапса [13] также демонстрировали устойчивость к повышенным

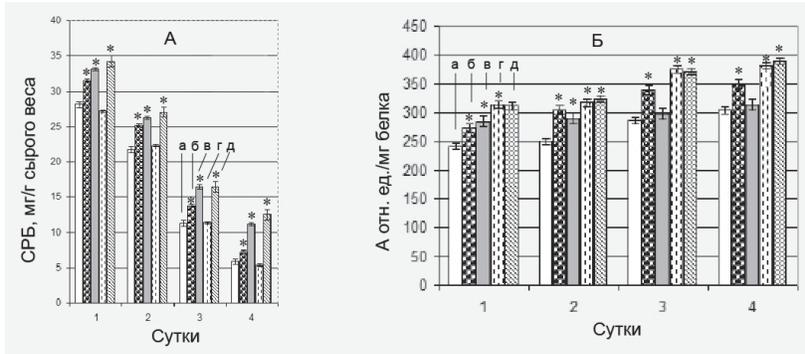


Рис. 2. Динамика изменений суммарного растворимого белка (А) и активности супероксиддисмутазы (Б) у контрольных и трансгенных проростков: а – Вп 12 (к), контроль; б, в, г, д – биотехнологические линии Т2 12в, Т2 1а, Т2 14в, Т2 2в; * – различия достоверны при $P < 0,05$.

температурам, что подтверждено с помощью определения выхода электролитов и относительной выживаемости на стадиях 3–4 листьев и 5–6 листьев. Они характеризовались сокращенным вегетативным периодом – половина из них зацвела на 7–14 дней раньше исходной линии. Подобные физиологические изменения отмечены и в работе [4] по получению трансгенных растений табака с геном *сур11А1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка, и в наших экспериментах [8]. Этот факт наряду с повышенной активностью СОД в двух группах биотехнологических растений рапса и сходным ответом на воздействие повышенной температуры позволяет сделать заключение, что в наших экспериментах введение гена *сур11А1* цитохрома P450_{SCC} влечёт за собой изменения в активности супероксиддисмутазы, сравнимое по воздействию на растение с введением гетерологического гена *Mn SOD3. 1*.

Выводы

При температуре +8 °С практически не наблюдали прорастания семян рапса как исходного ярового сорта Мария, так и полученных на его основе трансгенных линий. При повышенной (+26 °С) температу-

ре биотехнологические линии наращивают большую биомассу, формируют более длинные корни и гипокотили, у них активнее работает супероксиддисмутаза. Перспективны для дальнейшего изучения проанализированные линии Вп12/93/1а и Вп12/93/2в.

Работа финансировалась в рамках целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины «Биомаса як паливна сировина» («Биопалива»), проект №0111U004455.

Список литературы

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. – Vol. 15, № 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 *cyp1A1* gene // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 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 // PNAS. – 2007. – Vol. 104, № 43. – P. 16816 – 16821.
4. Сливак С.Г., Бердичевец И.Н., Ярмолинский Д.Г. и др. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *СУР11А1* цитохрома P450_{SCC} // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.

5. *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. – Vol. 14. – P. 151–162.
6. *Picciani A., Dance R., Alban C.* The plant biotin syntase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein compartments// J. Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 27. – P. 24906 – 24975.
7. *Jacquot J.-P., Suzuki A., Pyere J.-B., et al.* On the specificity of pig adrenal ferredoxin (adrenodoxin) and spinach ferredoxin in electron-transfer reaction// Eur. J. Biochem. – 1988. – Vol. 174. – P. 629–635.
8. *Сахно Л.А., Моргун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В.* Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения// Биотехнология. – 2010. – Т.3, № 5. – С. 74–82.
9. *Сахно Л.А., Остапчук А.Н., Ключко В.И., Банникова М.А., Кучук Н.В.* Изменения в составе жирных кислот у трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения// Факторы экспериментальной эволюции организмов. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2010. – Т.9. – С.327–331.
10. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, № 2. – P. 248 – 254.
11. *Beyer W.F., Fridovich I.* Assaying for superoxide-dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions// Anal. Biochem. – Vol. 161, № 2. – 1987. – P. 559 – 566.
12. *Лакін Г.Ф.* Биометрия // М.: Высш.школа. – 1990. – 352 с.
13. *Gusta L.W., Benning N.T., Wu G. et al.* Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agribiotechnology// Mol. Breeding. – 2009. – Vol. 24, № 2. – P. 103–115.
14. *McKersie B.D., Bowley S.R., Jones K.S.* Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase// Plant Physiology. – 1999. – Vol. 119. –P. 839–847.
15. *Samis K., Bowley S.R., McKersie B.D.* Pyramid Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa// Journal of Experimental Botany. – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1343–1350.
16. *Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргун Б.В., Матвеева Н.А., Кучук М.В.* Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду Баста, що містять ген *суп11А1* цитохрому P450_{SCC}// Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2009. – Т. 7. – С. 245–250.
17. *Zielinski H., Piskula V.R., Michalska A., Kozłowska H.* Antioxidant capacity and its components of cruciferous sprouts// Pol. J. Food Nutr. Sci. – 2007. – Vol. 57, № 3. – P. 315–322.
18. *Diaz-Vivancos P., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Hernandez J.A.* Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants// Biologia plantarum. – 2010. – Vol. 54, № 1. – P. 76–82.
19. *Matamoros M.A., Loscos J., Dietz K.-J. et al.* Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits// Journal of Experimental Botany. – 2010. – Vol. 61, № 1. – P. 87–97.

Представлена Е.Н. Тищенко
Поступила 15.06.2011

ОСОБЛИВОСТІ ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ РОСЛИН РІПАКУ, ЯКІ ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕН *СУР11А1* ЦИТОХРОМУ P450_{SCC} ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Л.О. Сахно

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148
e-mail: sakhno2007@ukr.net

Досліджено вплив температур +8 °C і +26 °C на проростання насіння ярого ріпаку сорту Марія і отриманих на його основі трансгенних ліній, які експресують ген *суп11А1* цитохрому P450_{SCC} мітохондрій кори надниркових залоз бика. Показано, що за температури +8 °C практично відсутнє проростання насіння ріпаку як вихідного сорту, так і біотехнологічних ліній. За підвищеної (+26 °C) температури дві з чотирьох трансформованих ліній нарощують більшу, ніж контрольні, біомасу, в них активніше працює один з ферментів антиоксидантної системи – супероксиддисмутаза. Ці лінії перспективні для подальшого дослідження при створенні на їх основі ліній ріпаку, стійких до підвищених температур.

Ключові слова: *Brassica napus*, *суп11А1*, цитохром P450_{SCC}, ріпак, проростки, супероксиддисмутаза.

SEED GERMINATION FEATURES OF CANOLA
PLANTS EXPRESSING MAMMALIAN
CYTOCHROME P450_{SCC} *CYP11A1* GENE

L.O. Sakhno

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 148
e-mail: sakhno2007@ukr.net

The effect of temperatures +8 °C and +26 °C on seed germination of spring canola cv. Maria and derived from it corresponding transgenic lines expressing cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene from bovine adrenal cortex mitochondria, was

investigated. Seeds was shown practically fail to germinate at +8 °C both in original canola variety and the biotechnological lines. At higher (+26 °C) temperature two from four transgenic lines build up greater biomass as compared with control ones, the enzyme of their antioxidant system, superoxide dismutase, is operating more actively. These lines appear to be promising for further research to create canola lines resistant to higher temperatures.

Key words: *Brassica napus*, *cyp11A1*, cytochrome P450_{SCC}, canola, seedlings, superoxide dismutase.