

Выводы.

Появление SNP-маркеров, способных увеличить плотность существующих генетических карт, породило две основные проблемы. Первая проблема, техническая, связана с необходимостью обрабатывать значительно больший объём информации. Вторая проблема, алгоритмическая, ставит вопрос: как извлечь ожидаемые результаты? Представленная работа посвящена решению второй проблемы. Предлагаются два алгоритма построения генетических карт. Один направлен на построение карт, когда практически

отсутствуют абсолютно-сцепленные маркеры. Второй показывает, что при наличии множеств абсолютно-сцепленных маркеров карты могут быть построены с очень высокой точностью. Важным моментом является понимание того, что наличие определённого уровня ошибок при аллельной идентификации SNP-маркеров ограничивает плотность маркеров генетической карты некоторой величиной, не зависящей от объёма популяции.

Литература

1. Mester D., Ronin Y., Minkov D., Nevo E., Korol A. Constructing Large Scale Genetic Maps Using Evolutionary Strategy Algorithm // *Genetics*. – 2003 – Vol. 165. – P. 2269–2282.
2. Ronin, Y., D. Mester, D. Minkov, A.B. Korol. Building reliable genetic maps: Different mapping strategies may result in different maps // *Nat. Science*. – 2010 – Vol. 2. – P. 576–589.

RONIN Y.I., MINKOVA D.M., MESTER D.I., KOROL A.B.

University of Haifa, Institute of Evolution

Israel, 31905, Haifa, Mount Carmel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

METHODS OF GENETIC MAPPING USING SNP-MARKERS

Aims. The appearance of SNP-markers leads to the increasing of density of existing genetic maps and simultaneously has generated two major problems. The first problem is technical; associated with the processing of much more information. The second problem, algorithmic, raises the question: how to derive the expected results? **Methods.** Two algorithms of genetic mapping are proposed. One of them aims to maps building without any bound-together markers. It is based on the removing of all the markers from some area of chosen markers. The second method is applied when there are some groups of bound-together markers. It is based on the use of one representative from each set of bound-together markers. **Results.** Both methods allow solving of the problem; however the second method can only work at a reasonable population size, which does not lead to the total destruction of the sets of bound-together markers. Maps can be built by this method with very high precision. Moreover, this method uses earlier developed algorithms. **Conclusions.** Specified level of errors in the identification of alleles of SNP-markers limits the density of markers on the genetic map by some value that is independent of population size.

Key words: SNP-markers, genetic mapping, bound-together markers.

САХНО Л.А.¹, СЛИВЕЦ М.С.^{1,3}, ПЕТЕРСОН А.А.¹, КОРОЛЬ Н.А.², КАРБОВСКАЯ Н.В.², ОСТАПЧУК А.Н.², КУЧУК Н.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Заболотного НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

³*Национальный технический университет Украины «Киевский Политехнический Институт», Украина, , 03056, Киев, пр. Победы, 37*

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ РАПСА С ТРАНСГЕНОМ *CYP11A1* В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

В связи с меняющимися климатическими условиями важной становится такая характеристика растений как устойчивость к стрессовым

факторам различного происхождения.

Устойчивость к повреждающим воздействиям определяется в том числе и свойствами

мембран, которые в свою очередь зависят от липидного состава и степени десатурации жирных кислот в них [1]. Растения табака *Nicotiana tabacum* с повышенным содержанием линоленовой кислоты, благодаря сверхэкспрессии генов *FAD3* и *FAD8*, обладали повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу и большей чувствительностью к повреждению высокими температурами [2]. Растения пустынь имеют пониженный уровень десатурации жирных кислот в липидах листьев [3]. У мутантов арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, несинтезировавших триеновые жирные кислоты из-за молчания генов *fad3-2*, *fad7-2* и *fad8*, в условиях повышенных температур увеличивалось содержание насыщенной пальмитиновой кислоты и уменьшалось содержание триненасыщенных жирных кислот [4].

Нами были созданы трансгенные растения ярового рапса, в ядерный геном которых введен ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [5]. Они выдерживали обработку гербицидом BASTA в условиях теплицы за счёт экспрессии гена *bar*, который использовался в конструкции в качестве селективного. Некоторые трансформанты накапливали

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала использовали поддерживаемые в асептических условиях растения ярового рапса (*Brassica napus* L.) сорта Мария (тип "00") (контроль) и трансформанты второго поколения с геном *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [5] – растения гомозиготных линий T₂1a и T₂2в. Их высаживали в грунт в условиях теплицы (12/12 фотопериод, +23°C). Через две недели адаптированные растения переносили в климакамеру Programmable Plant Growth Chamber, модель WGC-P9 (WiseCube® WGC, Корея).

Тест на устойчивость к повышенным температурам проводили спустя две недели выращивания растений в климакамере при следующих параметрах: 16ч (свет)/8ч (темнота) фотопериод, температура +22°C (день)/+18°C (ночь), влажность - 70%, освещенность - 480-550 μM м⁻² сек⁻¹). Влажность и освещенность оставляли без изменений. Температуру поднимали каждый час на 2°C до 42°C, затем её поддерживали постоянной в течение 16 час согласно [9].

Газовая хромато-масс-спектрометрия

повышенное количество суммарного растворимого белка в листьях и семенах. Антиоксидантная активность тканей листа у них возрастала. Анализ прорастания семян рапса с трансгеном *sup11A1* при повышенной (+26°C) температуре выявил отличия между проростками в накоплении биомассы, длине корней и гипокотилей, активности одного из ферментов антиоксидантной системы растений – супероксиддисмутазы [6]. Трансгенные линии отличались от исходных растений и между собой по устойчивости к осмотическому стрессу, индуцированному маннитолом [7]. С помощью газовой хромато-масс-спектрометрии было показано, что экспрессия гетерологичного гена не изменяет общего количества жирных кислот в семенах гомозиготных линий T₂ поколения, однако влияет на содержание некоторых из них. Количество основной жирной кислоты в масле рапса – олеиновой – возрастало на 6% (до 72,67 M%), количество линоленовой уменьшалось на 30-40% (до 3,89 M%) [8].

Целью данной работы было изучение возможных изменений в составе жирных кислот листьев рапса с трансгеном *sup11A1* в норме и в условиях высокотемпературного стресса.

эфиров жирных кислот. Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили одноэтапно по методике [10].

Определение метиловых эфиров жирных кислот выполняли на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США) с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м×0,25мм×0,25мкм) (J&W Scientific). Хроматографическое разделение происходило в режиме от 150°C до 220°C с градиентом 2°/мин, температура испарителя - 250°C. В качестве газоносителя 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). В качестве внутреннего стандарта использовали гептадекановую кислоту (C17:0).

Индекс ненасыщенности, характеризующий ненасыщенность жирных кислот в липидах, рассчитывали по формуле:

$$(\sum C_{n:1} + 2\sum C_{n:2} + 3\sum C_{n:3})/100,$$

где $C_{n:l}$ – содержание (весовые %) соответствующих ненасыщенных жирных кислот.

Результаты и обсуждение

Качественный состав жирных кислот листьев рапса трансгенных растений не отличался от контрольных (рис.1): это (в порядке убывания по количеству) линоленовая (18:3), пальмитиновая (16:0), 7,10,13-гексадекатриеновая (16:3), линолевая (18:2), пальмитолеиновая (16:1).

В условиях без стресса количество линоленовой кислоты в листьях одной из трансгенных линий (Т₂в) не отличалось от контрольной (58,48±1,61 и 59,07±1,04 М%, соответственно) (рис.1). У линии Т₂а оно было на 0,05% достоверно ниже (56,28±1,47). В результате высокотемпературного воздействия содержание линоленовой кислоты у трансгенных линий оставалось без изменений, тогда как у исходной оно снижалось на 2,43 М% (0,04%). Таким образом, отмечены незначительные достоверные различия в количестве линоленовой кислоты в листьях между трансгенными и контрольными расте-

ниями рапса как в нормальных условиях, так и при повышенных температурах.

Не обнаружены различия в количестве пальмитиновой кислоты у исходных и трансгенных растений (рис. 1) в благоприятных условиях выращивания. Однако при высокотемпературном стрессе оно возросло у трансгенных на 12% (линия Т₂а) – 19% (линия Т₂в), что свидетельствует об их лучшей приспособляемости к повышенным температурам [1, 4]. У исходных растений количество пальмитиновой кислоты при повышенной температуре не изменялось.

В условиях без стресса количество пальмитолеиновой кислоты у контрольных растений было ниже, чем у трансгенных на 31%. При стрессе оно возросло до уровня трансгенных растений. У линий Т₂а и Т₂в количество 16:1 кислоты в условиях повышенных температур оставалось неизменным (~4М%).

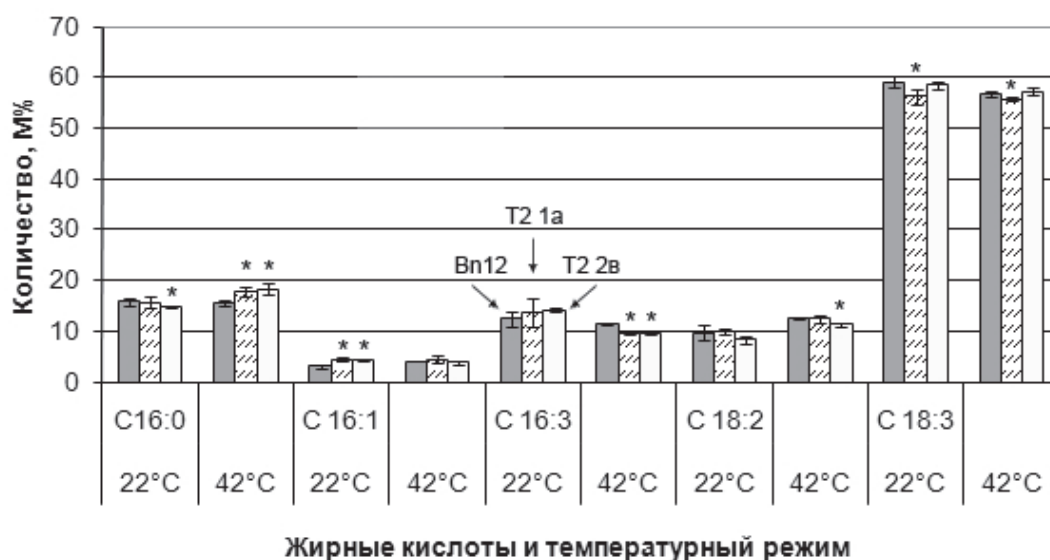


Рис. 1. Жирнокислотный состав липидов листьев рапса до (22°C) и после (42°C) высокотемпературного стресса: Vn12 – растения исходного сорта Мария, Т₂а и Т₂в – гомозиготные линии второго поколения с трансгеном *sup11A1*, жирные кислоты – пальмитиновая (С16:0), пальмитолеиновая (С16:1), 7,10,13-гексадекатриеновая (С16:3), линолевая (С18:2), линоленовая (С18:3). *– различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$

Количество 16:3 кислоты при 22°C не отличалось у исходных и трансгенных растений (~13М%). При высокотемпературном стрессе оно оставалось неизменным у контрольных растений и снижалось у трансгенных на 31-33%. Снижение количества триненасыщенных жирных кислот в липидах листьев является предпосылкой для лучшего противостояния повреждающему действию высоких температур [11].

Содержание линолевой кислоты возросло у растений всех проанализированных линий

при повышенной температуре на ~24%. Не обнаружено различий между контрольными и трансгенными растениями в количестве линолевой кислоты как в условиях стресса, так и без него.

Обнаружено, что у растений рапса с трансгеном *sup11A1* общее количество жирных кислот в листьях достоверно ниже (на ~27%), чем у контрольных при выращивании в условиях климакамеры при 22°C (рис.2, А).

В результате высокотемпературного

стресса количество липидов в листьях контрольных растений снижалось на 33%, в то время как у трансгенных этот показатель оставался без изменений. В условиях повышенных температур превышение количества жирных кислот в листьях рапса с трансгеном *sup11A1* над контрольными составляло 20-25%. Таким образом, высокотемпературный стресс не приводил к изменениям в количестве липидов листьев рапса с трансгеном *sup11A1* и понижал его у исходных растений.

Индекс ненасыщенности при благоприятной температуре был одинаковым у исходных и трансгенных растений (рис.2, Б). При +42°C в условиях климакамеры он не изменялся в листьях исходного рапса, а для трансгенных отмечено его достоверное снижение с 2,39 до 2,27 (на 0,05%). Снижение индекса ненасыщенности мембранных липидов является одним из параметров, характеризующим растения, устойчивые к высоким температурам [11].

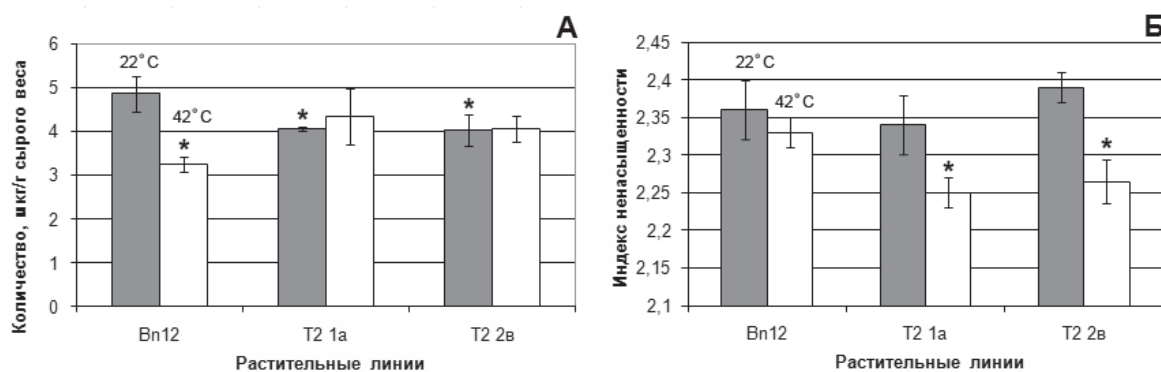


Рис. 2. Общее количество жирных кислот (А) и индекс ненасыщенности мембранных липидов (Б) в листьях растений рапса до (22°C) и после (42°C) высокотемпературного стресса: Bn12 – растения исходного сорта Мария, T₂1a и T₂2v – гомозиготные линии второго поколения с трансгеном *sup11A1*. * – различия достоверны по сравнению с контролем при P ≤ 0,05

Выводы

В результате газо-хроматографического анализа жирных кислот, выделенных из листьев рапса с трансгеном *sup11A1*, показано, что качественный состав жирных кислот не претерпевал изменений в обеих группах растений. В условиях благоприятной температуры (+22°C) не наблюдалось различий между исходными и трансгенными растениями в содержании пальмитиновой, 7,10,13-гексадекатриеновой (16:3), линолевой, линоленовой кислот. Количество пальмитолеиновой кислоты у контрольных растений оказалось на 31% ниже, чем у трансгенных. Индекс ненасыщенности был одинаковым у всех проанализированных растений, а количество жирных кислот у трансгенных растений на ~27% ниже, чем у контрольных.

В результате высокотемпературного (+42°C) стресса у трансгенных растений изменялось содержание пальмитиновой (+19%), 16:3 (-33%) и линолевой (+24%) кислот. Исходные

растения реагировали на высокую температуру увеличением содержания пальмитолеиновой и линолевой кислот на 31% и 24%, соответственно. Количество липидов листьев рапса с трансгеном *sup11A1* не изменялось, у исходных растений оно снижалось на 33%. Индекс ненасыщенности оставался неизменным у исходных растений и достоверно уменьшался у трансгенных на 0,03 %.

Таким образом, введение трансгена *sup11A1* в растения рапса обеспечивало повышение максимально на 25% содержания жирных кислот в листьях в условиях высокотемпературного стресса и уменьшало индекс ненасыщенности на 0,03%. Увеличение количества насыщенных (16:0) и уменьшение триеновых (16:3) жирных кислот в листьях трансгенных растений создает предпосылки для их большей устойчивости к повышенным температурам по сравнению с исходными растениями.

Литература

1. Murata N., Los D.A. Membrane Fluidity and Temperature Perception // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 11, №5. – P. 875-879.
2. Zang M., Barg R., Yin M. et al. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cell and plants // *Plant J.* – 2005. – Vol. 44. – P. 361-371.
3. Pearcy R. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. // *Plant Physiology.* – 1978. – Vol. 61. – P. 484-486.
4. Routaboul J.-M., Skidmore C., Wallis J. G., Browse J. Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids // *J. Exp. Botan.* – 2012. – Vol. 63, №3. – P. 435-1443.
5. Сахно Л.А., Моргун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // *Біотехнологія.* – 2010. – Т.3, №5. – С. 74-82.
6. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.* – 2011. – Т. 9, №2. – С. 253-259.
7. Трегуб М.С., Сахно Л.А. Особенности роста трансгенных растений рапса с геном *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} в условиях осмотического стресса // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології* (за ред. Кунаха В.А.). – 2012. – Т. 4. – С. 623-628.
8. Sakhno L.O., Ostapchuk A.M., Klochko V.V., Kuchuk M.V. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* gene // *Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph – part III. Editor-in-Chief Edward Szlyk.* – Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń. – 2011. – P. 55-59.
9. Gusta L.W., Benning N.T., Wu G. et al. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // *Mol. Breeding.* – 2009. – Vol. 24, №2 – P. 103-115.
10. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // *Analytical Biochemistry.* – 1993. – Vol. 211. – P. 139-143.
11. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 53. – P. 225-245.

SAKHNO L.O.¹, SLYVETS M.S.^{1,3}, PETERSON A.A.¹, OSTAPCHUK A.M.², KOROL N.A.², KARBOVSKA N.V.², KUCHUK M.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine
Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

²*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 154,*

³*National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”
Ukraine, 03056, prospect Peremogy, 37*

FATTY ACID COMPOSITION OF *CYP11A1* CANOLA LEAVES UNDER HEAT SHOCK

Aims. Investigation of *cyp11A1* gene influence on leaf fatty acid composition of canola. **Methods.** Gas chromatography of fatty acid methyl esters. **Results.** Qualitative fatty acid composition of transgenic leaves remained unchanged in comparison with the wild plants. There were no differences between *cyp11A1* and initial canola in 16:0, 16:3, 18:2 and 18:3 acid content under appropriate temperature (+22°C). But palmitoleic acid content was lower by 31% in the control than in transgenic plants. Total lipid content was 27% lower in transgenic plants than in the control ones. Heat shock (+42°C) stress did not lead to the change in total lipids in *cyp11A1* leaves and lowered it in initial plants by 31%. As a result of stress the content of palmitic (+19%), 16:3 (-33%) and linoleic (+24%) acids was changed in transgenic leaves. Initial plants reacted to the high temperature by increasing in palmitoleic (31%) and linoleic (24%) acids. **Conclusions.** The introduction of *cyp11A1* gene in canola nuclear genome affected total lipid content by increasing up 25% and unsaturation index by decreasing 0,03% under heat.

Key words: transgenic canola, *cyp11A1*, gas chromatography, fatty acids