

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — vol. 15, № 3. — P.473-497.

8. Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation // *J. Exp. Bot.* — 1998. — vol. 49, № 326. — P.1589-1595.

9. K.H. Lipp João, Brown T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>r</sup>::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // *Plant Cell Rep.* — 1993. — vol. 12, № 7-8. — P.422-425.

10. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* — 1987. — vol. 163, № 1. — P.16-20.

**Резюме** Отримано 8 трансгенних ліній картоплі сорту Луговська після *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації штамом, що несе ген *bar* та ген *cyp11A1* цитохрому P450<sub>scc</sub> кори надниркових залоз бика. 4 із 8 рослин мали аномальну морфологію. Проведений ПЛР-аналіз на гени *bar* і *cyp11A1* підтвердив інтеграцію цих генів в геном всіх отриманих трансформованих ліній. Транскрипція гена *cyp11A1* підтверджена ПЛР аналізом зворотних транскриптів.

Получено 8 трансгенных линий картофеля сорта Луговская после *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации штаммом, несущим ген *bar* и ген *cyp11A1* цитохрома P450<sub>scc</sub> из коры надпочечников быка. 4 из 8 растений имели аномальную морфологию. Проведенный ПЦР-анализ на гены *bar* и *cyp11A1* подтвердил интеграцию этих генов в геном всех полученных трансформованных линий. Транскрипция гена *cyp11A1* подтверждена ПЦР-анализом обратных транскриптов.

Eight PPT-resistant potato lines were obtained after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with a gene construct carrying *bar* gene and *cyp11A1* gene of cytochrome P450<sub>scc</sub> from bovine adrenal cortex. Four out of eight plants had abnormal morphology. Integration of foreign genes in genome for all plants was confirmed by PCR analysis. Transcription of *cyp11A1* gene was confirmed by RT-PCR analysis.

**САХНО Л.А., МОРГУН Б.В., КИЩЕНКО Е.М., КУЧУК Н.В.**

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

*Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno2007@ukr.net*

### **НАСЛЕДОВАНИЕ ВВЕДЕННЫХ ГЕНОВ *BAR* И *CYP11A1* ЦИТОХРОМА P450<sub>scc</sub> ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В T<sub>1</sub> ПОКОЛЕНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И РАПСА**

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 счёт экспрессии генов, участвующих у млекопитающих в метаболизме ксенобиотиков (*cyp1A1*, *cyp2B6*, *cyp2C19*, *cyp2E1*) [1,2,3], а также ускорению темпов роста благодаря синтезу не присущих растительным тканям биологически-активных молекул (*cyp11A1*) [4]. Растения риса [1] способны расти на почвах, содержащих атразин и метолахлор, и накапливать их, очищая почву. Картофель с активным геном *cyp1A1*, полученным из печени крысы, демонстрирует устойчивость к гербицидам хлортолуруну и метабензтиазуруну [2]. Тополя, экспрессирующие ген *cyp2E1* цитохрома P450 из печени кролика, способны поглощать такие ядовитые вещества, как трихлорэтилен,

винилхлорид, четырёххлористый 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 *sup11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения, опережают контрольные в среднем на две недели 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, в том числе рапса и табака, важны для сельхозпроизводителей.

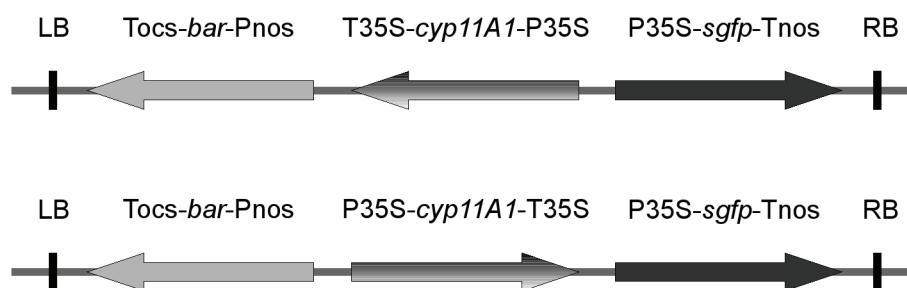
Целью данной работы было получение растений табака и рапса, несущих в ядерном геноме ген *sup11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка, и анализ наследования в первом поколении трансформантов.

#### 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 УААН, Магнат (селекция РУП «Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию»), а также растения табака *Nicotiana tabacum* сортов Wisconsin и Petite Havana.

**Agrobacterium tumefaciens-опосредованная трансформация рапса и табака.** Трансформацию рапса проводили согласно методике, разработанной нами ранее [5], регенерацию трансгенных растений табака получали по общепринятой методике [6]. Селекцию растений проводили в присутствии в средах фосфинотрицина (PPT, 5 мг/л).

**Плазмиды и бактериальный штамм.** В качестве донора гена *sup11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка использовалась плаزمида pGBP450f, полученная из Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Бинарный вектор pICH5290 служил реципиентом гена *sup11A1* и основой для двух генетических конструкций - pCB092 и pCB093. Использовались компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (Stratagene), а трансформация осуществлялись общепринятым химическим методом [7]. Для работы с растительными тканями использовался



*Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101.

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

**Анализ полученных растительных линий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).** Для подтверждения введения генов *bar* и *sup11A1* 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 пн (*bar*), и 5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' и 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3', дающие фрагмент размером 502 пн (*sup11A1*) [4]. Для проверки отсутствия агробактериальной ДНК в полученных растительных линиях проводили ПЦР с праймерами на *virD1*. Для амплификации фрагмента этого гена длиной 432 пн 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' [8]. Для реакции брали 200 нг геномной ДНК каждого образца, по 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,2 мкМ смеси четырёх дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 единицу Taq полимеразы в однократном реакционном буфере. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Программа амплификации была следующей: денатурация 94 °С, 4 мин; 35 циклов — 56 °С 1 мин; 72 °С, 20 сек; 94 °С, 30 сек; заключительный цикл — 10 мин при 72 °С.

**Определение количества растворимого белка в листьях рапса.** Для анализа количества белка в листьях растений рапса, поддерживаемых в асептической культуре, применяли микрометод Бредфорда [9]. Для экстракции белков использовали тройной объем 100 мМ Tris-Cl буфера (рН 8,0), содержащего 5 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 100 мМ NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанола и 2,5 % поливинилпирролидона. Анализ проводили на спектрофотометре BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35.

**Статистическая обработка результатов** проводилась оценкой разности средних (*t*-критерий Стьюдента) при сравнении количеств белка и определением критерия  $\chi^2$  при расщеплении в T<sub>1</sub> поколении трансформантов согласно [10].

### Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов по трансформации листовых дисков с использованием двух генетических конструкций получено 46 независимых фосфинотрициностойчивых линий рапса трёх промышленных яровых сортов (6 линий, вектор pCB092, с использованием сорта Калиновский, 7 и 11 линий, вектор pCB093, с использованием сортов Мария и Магнат, соответственно) и 29 линий табака двух сортов (9 и 11 линий, вектор pCB092, с использованием сортов Wisconsin и Petite Havana, соответственно, и 8 линий, вектор pCB093, с использованием сорта Petite Havana). Интеграция целевого гена *cup11A1* и селективного гена *bar* показана с помощью ПЦР для 24-х из 28-ми проанализированных линий рапса и всех линий табака. С помощью реакции амплификации с праймерами на ген *virD1* показано отсутствие бактериального заражения полученных трансформантов.

Трансгенные растения табака были высажены в почву в условиях теплицы. Оказалось, что при самоопылении семена завязываются у всех растений, полученных в результате экспериментов с вектором pCB093, и только у двух из 10, регенерировавших и образовавших цветки в опытах с использованием вектора pCB092. При опылении трансформанта pCB092/A6 пыльцой растения дикого типа семена завязались. Возможно, нарушение пыльцеобразования связано с особенностями конструкции (взаиморасположение генов в T-ДНК, **рис.**).

Растения пяти линий рапса также были перенесены в грунт в условиях теплицы. В результате самоопыления получены жизнеспособные семена. Проростки анализировались *in vitro* на устойчивость к фосфинотрицину (**табл.**). У отобранных линий поколения T<sub>1</sub>, растущих в присутствии 10 мг/л PPT *in vitro*, при анализе с помощью ПЦР показано наличие введенных генов *bar* и *cup11A1*.

**Табл.** Характеристика T<sub>1</sub> поколения трансформантов рапса (сорт Мария, вектор pCB093)

Линия	Масса 1000 семян, г	Всхожесть <i>in vitro</i> , %	Количество растений		Расщепление	$\chi^2$
			PPT <sup>+</sup>	PPT <sup>-</sup>		
Vn12/93/1	3,213	99	73	26	3:1	0,12
Vn12/93/2	3,118	96	73	23	3:1	0,13
Vn12/93/11	3,209	94	72	22	3:1	0,13
Vn12/93/12	3,188	98	72	26	3:1	0,12
Vn12/93/14	3,257	90	68	22	3:1	0,01
Vn12 (контроль)	3,249	96	-	96	-	-

При определении количества растворимых белков в листьях исходных растений рапса, трансформантов T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>, культивируемых в асептических условиях, оказалось, что различия не являются статистически достоверными (результаты не представлены). В публикации [11] сообщалось, что уровень белка в листьях трансформированных растений табака, несущих ген *cyp11A1* и полученных в результате ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов, значительно увеличивался. Возможно, расхождения в наших результатах связаны с особенностями использованных растительных культур, способах введения ДНК в растения и/или особенностями экспрессии введенного целевого гена.

**Выводы.** С использованием сконструированных нами генетических конструкций, несущих гены *bar* и *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка, в результате *A.tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков получено 46 независимых РРТ устойчивых линий рапса трёх промышленных яровых сортов и 29 линий табака двух сортов. Показано, что введенные гены наследуются, и расщепление в первом поколении трансформантов *V.napus* при самоопылении близко к 3:1. Различия в накоплении растворимых белков листьями исходных растений рапса, трансформантов T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>, культивируемых в асептических условиях, не являются статистически достоверными.

### Литература

1. Kawahigashi H., Hirose S., et al. 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., 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., et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees // PNAS. - 2007. – V.104, N. 43. – P.16816 – 16821.
4. С.Г. Спивак, И.Н. Бердичевец, Н.А. Картель. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *CYP11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К., 2006. – С.639-644.
5. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є.А., Сахно Л.А. Кучук М.В. // Патент України на корисну модель № 39205. – Публ. 10.02.2009, бюл. № 3.
6. Horsch R.B., Fraley R.T., et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // Science. - 1984. – V. 223. – P. 496–498.
7. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1989.- 1500 p.
8. Lipp Joao K.H. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 Rif<sup>r</sup>:pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // Plant Cell Rep. - 1993. - V. 12. - P. 422-425.
9. 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. – V.72, N 2. – P.248 – 254.
10. Лакін Г.Ф. Биометрия // М.: Высш.школа. – 1990. – 352 с.
11. С.Г. Спивак, Морозова Е.В. и др. Влияние экспрессии гена *CYP11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения на гормональный статус и фенотип растений табака *Nicotiana tabacum* L. // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. – Киев. – 2007. – С.72 -73.

### Резюме

В результате *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков с использованием генетических конструкций, несущих гены *bar* и *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из митохондрий коры надпочечников быка, получено 46 независимых фосфинотрицинустойчивых линий рапса трёх промышленных яровых

сортов и 29 линий табака двух сортов. Интеграция чужеродных генов подтверждена с помощью ПЦР. Показано, что расщепление по введенным генам в первом поколении трансформантов при самоопылении составляет 3:1. Различия в накоплении растворимых белков листьями исходных растений рапса, трансформантов T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>, культивируемых в асептических условиях, не являются статистически достоверными.

В результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листових дисків з використанням генетичних конструкцій, що несуть гени *bar* і *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> з мітохондрій кори надниркових залоз бика, отримано 46 незалежних фосфінотрицистинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів і ліній тютюну двох сортів. Інтеграцію чужорідних генів підтверджено за допомогою ПЛР. Показано, що розщеплення по введеним генам в першому поколінні трансформантів за умов самозапилення становить 3:1. Відмінності в накопиченні розчинних білків листям вихідних рослин ріпаку, трансформантів T<sub>0</sub> і T<sub>1</sub>, які культивуються в асептичних умовах, не є статистично достовірними.

Forty six independent PPT-resistant lines of three Ukrainian commercial rapeseed varieties and twenty nine lines of two *Nicotiana tabacum* varieties were obtained as a result of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf disks with gene constructs carrying *bar* gene and *cyp11A1* cytochrome P450<sub>SCC</sub> gene from bovine adrenal cortex. Integration of the foreign genes was confirmed by PCR analysis. The self-pollinated first transgenic progeny demonstrated segregation of the introduced genes as 3:1. The difference among parent rapeseed plants, T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> transformants cultivated under aseptic conditions concerning total soluble protein in leaves was not statistically significant.

**СЕРГЕЕВА Л.Е.,<sup>1</sup> ПОРЕЦКАЯ Е.И.,<sup>1</sup> ГАМАЛЕЙ В.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,  
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская 31/17, e-mail: [e.poretskaya@gmail.com](mailto:e.poretskaya@gmail.com)

<sup>2</sup>Институт земледелия УААН,  
Украина, 08162, Киевская обл., п.г.т. Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

## **ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ БАРИЯ**

Растущее с годами число публикаций, посвященных различным аспектам солевого стресса и солеустойчивости, подтверждает постулат о фундаментальности и сложности поставленной проблемы. Выявление физиологических корреляционных взаимосвязей, расшифровка генетических механизмов устойчивости, однако, не увеличили количества полученных растительных форм, которые бы демонстрировали выдающиеся показатели солеустойчивости. Не упростились и сами методы их получения. Очевидна потребность поиска новых гипотез, подходов, методов.

Явление солеустойчивости достоверно связывают с поддержанием баланса катионов калия и натрия. Также было установлено, что ионы тяжелых металлов, воздействуя на мембранные системы переноса ионов калия, препятствуют его выведению из клетки [10,18]. В связи с вышеизложенным была высказана идея и разработан способ получения солеустойчивых клеточных линий растений с использованием селективных сред, содержащих ионы тяжелого металла бария [5]. Отобранные таким образом клеточные клоны табака оказались устойчивыми не только к селектирующему стрессору, но и к 20 г/л солей морской воды либо сульфата натрия.