

УДК 575.827:604.6:582.683.2

## ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД НАСІННЯ РІПАКУ З ТРАНСГЕНОМ *сyp11A1* ЦИТОХРОМУ P450<sub>SCC</sub>

Л. О. Сахно<sup>1</sup>А. М. Остапчук<sup>2</sup>В. В. Клочко<sup>2</sup>М. В. Кучук<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного  
НАН України, Київ

E-mail: sakhno@icbge.org.ua

Отримано 24.01.2012

З використанням газової хромато-мас-спектрометрії проаналізовано якісний і кількісний склад жирних кислот насіння ріпаку *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., вирощеного в умовах закритого ґрунту, з уведеним шляхом агробактеріальної трансформації геном *сyp11A1* цитохрому P450<sub>SCC</sub> великої рогатої худоби (*Bos primigenius taurus* L.). Показано, що експресія гетерологічного гена під конститутивним (35S) промотором не впливала на загальну кількість жирних кислот у насінні, але спричинювала кількісні зміни у їхньому складі. У другому поколінні трансгенних ліній спостерігали підвищення максимально на 6% (до 72,67 моль%) кількості олеїнової і зменшення майже вдвічі (до 3,89 моль%) кількості ліноленої кислоти. Проведені експерименти дають змогу більш повно охарактеризувати створені трансгенні лінії ріпаку, для яких попередньо показано збільшення кількості сумарного розчинного протеїну в листі і насінні, підвищення антиоксидантної активності тканин листа та активності супероксиддисмутази під час проростання насіння, скорочення періоду вегетативного розвитку на 5–7 діб і стійкість до оброблення гербіцидами на основі фосфінотрицину.

**Ключові слова:** *Brassica napus*, *сyp11A1*, газова хроматографія, жирні кислоти, ріпак, цитохром P450<sub>SCC</sub>.

Цитохроми P450 — монооксигенази — це ензими, що беруть участь у процесах біосинтезу регуляторних сполук, зокрема стероїдних гормонів [1]. Перспектива створення рослин з новими корисними характеристиками зумовлює необхідність дослідження наслідків уведення різних генів цитохрому P450<sub>SCC</sub> тваринного походження в геном рослин. Унаслідок експресії генів, які у ссавців беруть участь в метаболізмі ксенобіотиків (*сyp1A1*, *сyp2B6*, *сyp2C19*, *сyp2E1*), отримано рослини рису *Oryza sativa* L. [2], картоплі *Solanum tuberosum* L. [3], тополь *Populus tremula* x *Populus alba* [4], які здатні очищувати ґрунт і повітря, акумулюючи з них гербіциди і деякі сильні отрутохімікати (трихлоретилен, вінілхлорид, чотирихлористий вуглець, хлороформ і бензол).

Для трансгенних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* L. показано прискорення темпів росту і розвитку завдяки синтезу біологічно активних молекул, які не притаманні рослинним тканинам (прегненолон), через експресію гена *сyp11A1* [5]. Вони характеризувались також підвищенням рівня сумарного розчинного протеїну і розчинних вуглеводів у листі, збільшенням

загальної біомаси, розмірів і маси насіння. У насінні виявлено зміни в гормональному балансі — зменшення рівня 24R-брасиностероїдів [6].

Нами було створено трансформовані лінії ріпаку *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., які мали в своєму ядерному геномі ген *сyp11A1* цитохрому P450<sub>SCC</sub> тваринного походження [7]. Усі біотехнологічні лінії були стійкими до оброблення гербіцидом BASTA в умовах теплиці за рахунок експресії гена *bar*. Вплив експресії гетерологічного гена *сyp11A1* на рослини ріпаку також був плейотропним, як і в разі з трансгенним тютюном. Так, деякі трансформанти мали підвищену кількість сумарного розчинного протеїну в листках і насінні. Антиоксидантна активність тканин листків у них зростала, а вегетативна фаза розвитку скорочувалась. Формування суцвіть відбувалось на 5–7 діб раніше за контрольні рослини.

Ріпак використовують переважно як олійну культуру. Він посідає третє (після пальми і сої) [8] місце у світі за кількістю виробленої з нього олії. В Україні в 2010 році його вирощували на площі 862,5 тис. га, середня врожайність сягала 17,04 ц/га, отримано 1 млн. 469 тис. 700 т насіння [9].

Ріпакову олію застосовують для харчових цілей, у косметиці, в хімічній промисловості, для виробництва біопалива.

Дослідження в селекції ріпаку спрямовані насамперед на підвищення урожайності, олійності, а також на поліпшення якості олії. За хімічною природою олія ріпаку — це суміш складних ефірів гліцеролу і жирних кислот, головним чином пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої та лінолевої. Пластичність ріпаку і передові наукові підходи дали змогу створити за останні 50 років по суті нову культуру. У ріпаковій олії основною жирною кислотою була ерукова (40–45%). Зараз існують харчові сорти (канола), у яких основна жирна кислота — олеїнова (60–89%), а кількість ерукової зменшено до 0,3–3%. Олія ріпаку технічного використання характеризується підвищеним вмістом ерукової кислоти (72%). Окрім того, отримано рослини, які накопичують у насінні не притаманні вихідному ріпаковій жирні кислоти, що є основою використання в хімічній і фармацевтичній промисловості [10, 11].

Оцінка здатності фітостеринів ріпакової олії взаємодіяти з цитохромом P450<sub>SCC</sub> з мітохондрій кори надниркових залоз великої рогатої худоби показала, що β-ситостерол, як і холестерол (природний субстрат P450<sub>SCC</sub>), здатен викликати 1-й тип спектральних змін (збільшення поглинання в діапазоні A<sub>390–420нм</sub>). Це свідчить про те, що він може бути субстратом цього ензиму. β-Ситостероли і кампестерол з фітостеринової фракції ріпакової олії перетворюються на прегненолон ензиматичною системою цитохром P450<sub>SCC</sub> — адренодоксин — адренодоксин-редуктаза — НАДФН *in vitro* [12]. Уведення гетерологічного гена *cup11A1* в геном ріпаку й імовірно змінення за рахунок цього гормонального статусу рослин може вплинути на кількісний і якісний склад жирних кислот ліпідів насіння, отриманого з трансформованих рослин ріпаку. Вивчення цієї характеристики трансгенного рослинного матеріалу і було метою роботи.

### Матеріали і методи

*Рослинний матеріал.* Вихідними для трансформації були рослини ярого ріпаку сорту Марія типу «00» (ерукової кислоти — 0–0,1%, глюкозинолатів — 0,4–0,6%). Первинні трансформанти (T<sub>0</sub>) висаджували в ґрунт в умовах теплиці. Під час цвітіння використовували ізолятори. Проростки,

сформовані в результаті пророщування насіння, що утворилося шляхом самозапилення, тестували на стійкість до фосфінотрицину в умовах *in vitro*. Оцінювали розщеплення за ознакою стійкості до фосфінотрицину. Відбирали лінії з одиничною вставкою трансгена (розщеплення 3:1). Стійкі до фосфінотрицину рослини таких ліній (T<sub>1</sub>-покоління) висаджували в теплицю. Процедуру одержання насіння (самозапилення) і тестування проростків на стійкість до гербіциду повторювали. Знову оцінювали розщеплення за ознакою стійкості до фосфінотрицину і відбирали гомозиготні лінії (розщеплення відсутнє). Трансформанти ріпаку (T<sub>2</sub>-покоління — відібрані гомозиготні лінії Bn12/93/1a, Bn12/93/2в, Bn12/93/12в, Bn12/93/14в [7]) висаджували в теплицю. Насіння знов формувалося внаслідок самозапилення. Як матеріал для аналізу газовою хромато-мас-спектрометрією використовували насіння, отримане з рослин T<sub>2</sub>-покоління.

*Газова хромато-мас-спектрометрія ефірів жирних кислот.* Виділення жирних кислот та їх метилювання проводили одноетапно відповідно до [13]. Для приготування екстрактів брали 50 мг насіння. Пробу подрібнювали в ступці. Переносили рослинний матеріал у скляні пробірки із закручуваними кришками з тефлоновими прокладками і додавали спочатку 3,3 мл реакційної суміші: метанол:толуол:сірчана кислота в об'ємному співвідношенні 44:20:2, потім 1,7 мл гексану (метанол, толуол, гексан — HPLC-grade, Sigma-Aldrich, Німеччина; сірчана кислота — хч, Альфарус, Україна). Пробірки витримували на водяній бані при 80 °С протягом 2 год. Після охолодження за кімнатної температури їх обережно струшували, що призводило до розділення рідини на дві фази. Відбирали верхню, в якій концентрувались утворені метилові ефіри жирних кислот. Кислотність розчину доводили до нейтрального рН насиченням 1н розчином фосфату натрію.

Визначення жирнокислотного складу проводили із застосуванням газової хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США) з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина 30 м; внутрішній діаметр 0,25 мм; товщина нерухомої фази 0,25 мкм). Хроматографічне розділення відбувалось у градієнтному режимі від 150° до 220° з градієнтом температури 2°/хв. Як газ-носії використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Ідентифікацію проводили, застосо-

вучучи бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш метилових ефірів жирних кислот бактерій (Supelco). Внутрішнім стандартом слугувала гептадеканова кислота (C17:0) (хч, ABCR, Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили оцінюючи різницю середніх (*t*-критерій Стьюдента) [14].

### Результати та обговорення

Вивчення газ-спектрів зразків ефірів жирних кислот, які було отримано з насіння вихідного і T<sub>2</sub>-покоління трансформантів ріпаку, показало, що якісний склад жирних кислот всіх проаналізованих біотехнологічних ліній не відрізняється від такого у контрольних рослин. Водночас спостерігали відмінності в кількості основних жирних кислот ріпакової олії як між контрольною і трансформованими лініями, так і між різними трансгенними лініями (рис. 1).

Загальна кількість жирних кислот в насінні ріпаку біотехнологічних ліній залишалась на рівні контрольних рослин (рис. 2).

У більшості досліджень характеризуються тільки якісні зміни в жирнокислотному складі рослинної олії. Однак введення гетерологічних генів може призводити як до

зменшення, так і до збільшення олійності. Так, підвищення олійності спостерігали в насінні ріпаку, в якому експресувався ген *gpdI* дріжджів, що кодував цитозольну гліцерол-3-фосфат дегідрогеназу [15].

На накопичення жирних кислот може впливати активність епсилонциклаз, що каталізують біосинтез каротиноїдів. За зменшення (завдяки трансформації) експресії лікопенепсилонциклази в трансгенному насінні накопичувалось більше (у порівнянні з контролем) β-каротину, зеаксантину, віолаксантину і лютеїну, однак одночасно спостерігалось зменшення загальної кількості жирних кислот і незначні зміни в їх співвідношенні [16].



Рис. 2. Загальна кількість жирних кислот у насінні ріпаку:

Bn12 — контроль, сорт Марія; T2 1a, T2 12в, T2 14в, T2 2в — трансгенні лінії.

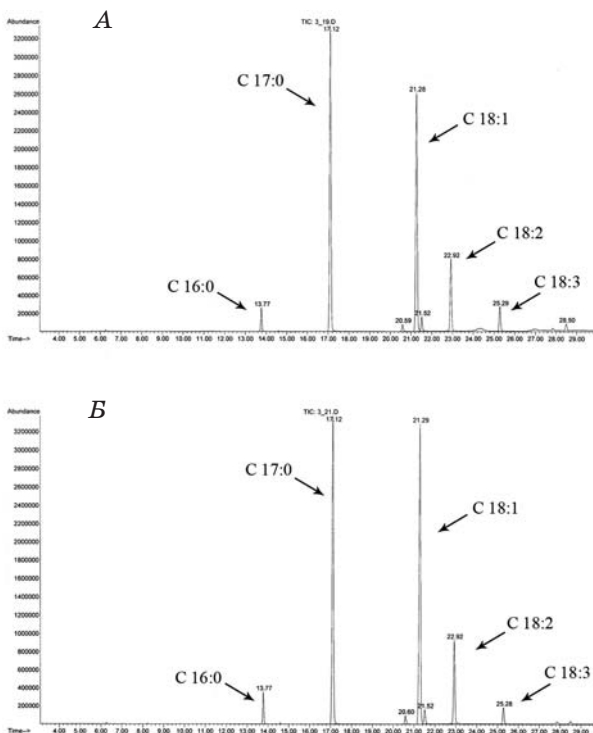


Рис. 1. Хроматограми ефірів жирних кислот з насіння:

А — контрольної лінії ріпаку;  
Б — трансгенної лінії Bn12/93/14в

Надекспресія власних ключових генів біосинтезу жирних кислот *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* і *LEC1-LIKE (L1L)* в насінні трансгенного ріпаку завдяки введенню додаткової копії під насіннеспецифічним промотором дозволила підвищити олійність на 20%. При цьому введення генів не призвело до змін інших важливих агрономічних характеристик [17].

Введення гена *cup11a1* цитохрому P450<sub>SCC</sub> тваринного походження під конститутивним (35S) промотором не впливало на загальну кількість жирних кислот у насінні.

Основною жирною кислотою ріпакової олії сортів «00» є олеїнова (C18:1). У чотирьох проаналізованих трансформованих ліній її кількість зростала. Для лінії Bn12/93/14в збільшення вмісту олеїнової кислоти було найсуттєвішим (72,67±1,52 моль%) порівняно з вихідним сортом Марія (66,31±1,13 моль%, рис. 3, В). Максимального підвищення рівня олеїнової кислоти шляхом трансгенезу (до 89%) вдалось досягти в експериментах Stoutjesdijk P. A. et al. [18] блокуванням процесу десатурації цієї кислоти Δ12-десатуразою за

введення косупресійної плазмиди. Подібні зміни в кількості олеїнової кислоти були характерні для відібраних спонтанних (85–90%) [19, 20] та індукованих (80–86%) [21, 22] мутантів ріпаку.

Кількість пальмітинової кислоти (C16:0) залишалась на рівні контролю (рис. 3, А). Для ліній Bn12/93/2в і Bn12/93/12в спостерігалось зниження кількості стеаринової кислоти, для двох інших ліній рослин цей показник залишався на рівні контролю (рис. 3, Б). Підвищення рівня олеїнової кислоти в експериментах [18] не супроводжувалося змінами рівнів насичених жирних кислот.

Кількість лінолевої кислоти (C18:2) в насінні досліджуваних рослин знижувалась максимально на 3,5 моль% (16,15±1,53 моль% у лінії Bn12/93/14в порівняно з 19,62±0,18 моль% у рослин контрольної лінії) (рис. 3, Г). Водночас зменшувалась кількість ліноленової кислоти в насінні всіх трансформованих ліній ріпаку на 30–40%, до 3,89±0,13 моль% у лінії Bn12/93/14в (рис. 3, Д). Подібний ефект спостерігали і в трансгенних рослин ріпаку, які несли антисенс-копію гена власної Δ12-десатурази [18]. Рівень поліненасичених (лінолева і ліноленова) жирних кислот у насінні цих рослин знижувався до 4%.

Поліненасичені жирні кислоти у складі насіння спричиняють прогоркання олії, що з нього отримана, завдяки здатності до більш швидкого окиснення через наявність більшої кількості подвійних зв'язків у молекулі порівняно з мононенасиченою (олеїновою). Тому зменшення їх вмісту є доцільним як для збільшення вмісту основної жирної кислоти — олеїнової, так і для підвищення строків зберігання виробленої олії.

Серед проаналізованих слід звернути увагу на лінію Bn12/93/14в, яка характеризувалась найсуттєвішим збільшенням олеїнової і зменшенням лінолевої і ліноленової кислот у насінні за збереження сумарної кількості жирних кислот, специфічної для вихідного сорту Марія. Беручи до уваги, що ця лінія є стійкою до фосфінотрицину [7] (діючої речовини гербіциду BASTA), вона може бути задіяна в роботі з отримання сортів ріпаку, стійких до гербіцидів на основі фосфінотрицину й зі зміненим складом олії. Їх можна використовувати і в харчових цілях, і як сировину для виробництва біодизеля.

Окрім того, заслуговують на увагу і лінії Bn12/93/2в та Bn12/93/1а. Вони мають стійкість до гербіцидів на основі фосфінотрицину; синтезують більше, ніж контрольна лінія, сумарного розчинного протеїну;

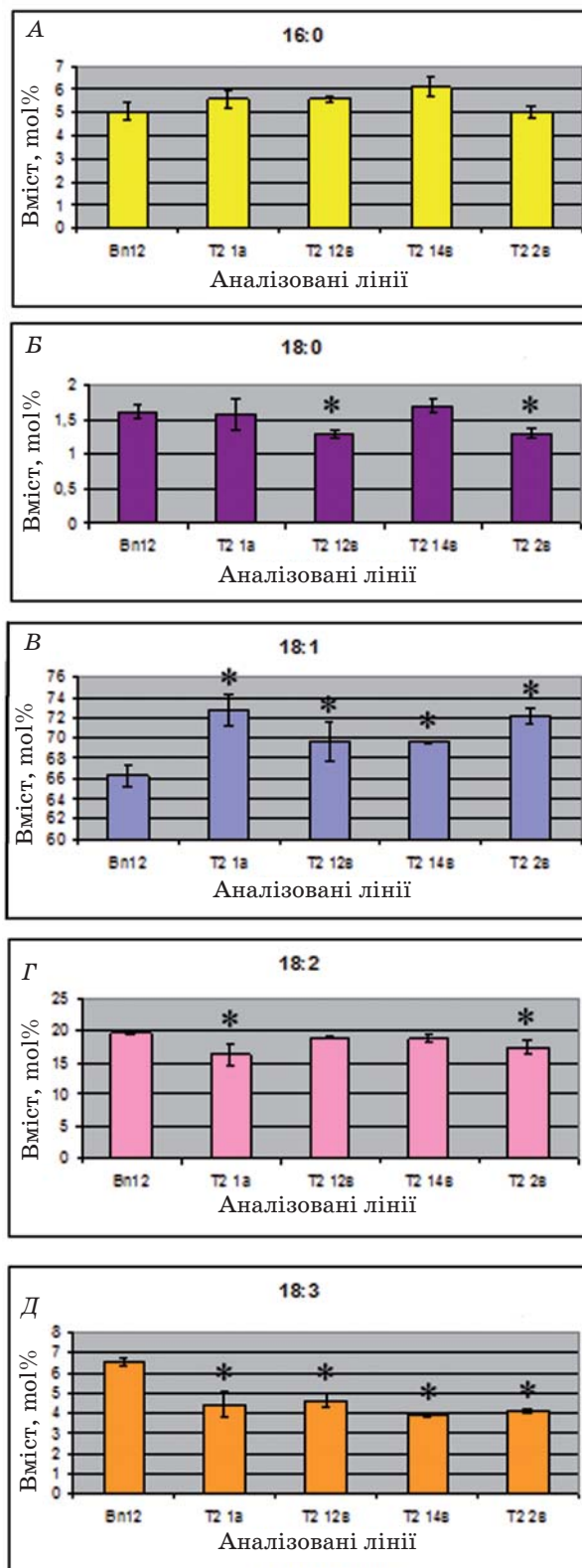


Рис. 3. Вміст жирних кислот в насінні ріпаку: А — пальмітинова; Б — стеаринова; В — олеїнова; Г — лінолева; Д — ліноленова. Bn12 — контроль, сорт Марія; T<sub>2</sub>1а, T<sub>2</sub>12в, T<sub>2</sub>14в, T<sub>2</sub>2в — трансгенні лінії.

\* — різниця між контролем і аналізованими лініями достовірна за P < 0,05.



антиоксидантна активність тканин листків у них підвищена; зацвітають в умовах теплиці на 5–7 дб раніше [7], накопичують олію в тій самій кількості, що й контрольна лінія; для них є характерним склад жирних кислот вихідної форми за винятком зменшеної кількості ліноленової кислоти, що поліпшує якість олії.

Змін у кількісному і якісному складі жирних кислот ріпакової олії можна досягти введенням генів десатураз, експресією гетерологічних генів синтаз, відбором мутантів різного походження і схрещуванням біотехнологічних та мутантних рослин [11, 21]. Для збільшення вмісту стеаринової кислоти в насінні ріпаку було проведено трансформацію з використанням конструкції з антисенс-копією гена  $\Delta 9$ -десатурази ріпи *Brassica rapa* під насіння специфічним промотором. Накопичення стеаринової кислоти зросло до 40% від загальної кількості жирних кислот [22]. Насіннеспецифічна експресія генів  $\Delta 6$ - і  $\Delta 12$ -десатураз із гриба *Mortierella alpina* дала змогу досягти стабільного накопичення в насінні невластивої для ріпаку  $\gamma$ -ліноленової кислоти (до 43%), яка має фармацевтичну цінність [23]. У результаті введення згаданих генів десатураз гриба *M. alpina* і додаткової копії гена ріпакової  $\Delta 15$ -десатурази отримали в насінні ріпаку стеаринонову кислоту (до 16–23% загальної кількості жирних кислот) [24].

Нами показано, що введення гена *cyp11A1* тваринного походження під конститутивним (35S) промотором також впливало на склад ріпакової олії. Однак збільшення кількості олеїнової кислоти було меншим, ніж у роботі [18]. Можливо, функціонування цього гена під насіннеспецифічним промотором сприяло би більш суттєвим змінам.

Дослідження щодо змін у жирнокислотному складі олії ріпаку було розпочато з відбору спонтанних мутантів зі зменшеним рівнем ерукової кислоти в насінні [25]. Дослідження останніх десятиліть дозволили

встановити нові важливі факти [26, 27]. Так, наприклад, вважали, що максимальний рівень ерукової кислоти, якого можна досягти з вихідних 40–45%, — це 66% [28]. Але поєднання методів класичної селекції та біотехнології уможливило отримання рослини зі вмістом цієї кислоти до 72% [29].

Уведення гена *cyp11A1* тваринного походження в геном ріпаку не призводило до кардинальних змін в якісному складі олії. Однак підвищення кількості олеїнової кислоти на 6% і зниження ліноленової кислоти вдвічі поліпшують як харчову цінність олії, так і її здатність до більш тривалого зберігання без втрати якості. Водночас досліджувані трансформовані рослини ріпаку мають низку переваг перед вихідними рослинами: збільшену кількість сумарного розчинного протеїну, підвищену антиоксидантну активність тканин листа, скорочений вегетативний період розвитку. Можливо, зміни за рахунок експресії зазначеного гетерологічного гена відбуваються і в жирнокислотному складі ліпідів, які входять до клітинних мембран. Всебічний аналіз створених біотехнологічних рослин ріпаку з геном *cyp11A1* доцільно продовжити дослідженнями реакцій рослин на абіотичні стреси.

Таким чином, введення гена *cyp11A1* цитохрому P450<sub>SCC</sub> тваринного походження в ядерний геном ріпаку вплинуло на кількісний склад жирних кислот у його насінні. Трансгенні лінії характеризувались максимальним 6%-м підвищенням (до 72,67 моль%) кількості олеїнової і зменшенням майже вдвічі (до 3,89 моль%) ліноленової кислоти. Загальна кількість жирних кислот залишалась на рівні контрольних рослин.

Роботу виконано в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина» («Біопалива»), проект № 0107U008096.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Morant M., Bak S., Møller B. L., Werck-Reichhart D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation // *Cur. Opin. Biotechnol.* — 2003. — V. 14. — P. 151–162.
2. 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.
3. 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. — V. 104. — P. 308–314.
4. Doty S. L., James C. A., Moore A. L. et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2007. — V. 104, N 43. — P. 16816 — 16821.
5. Спивак С.Г., Бердичевець И.Н., Ярмолинский Д.Г. и др. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana*

- tabacum* L., экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub>// Генетика. — 2009. — Т. 45, № 9. — С. 1217–1224.
6. Спивак С. Г., Бердичевец И. Н., Литвиновская Р. П. и др. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> из коры надпочечников быка// Биоорг. химия. — 2010. — Т. 36, №2. — С. 241–250.
  7. Сахно Л. А., Моргунов Б. В., Кваско Е. Ю., Кучук Н. В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного происхождения// Биотехнология. — 2010. — Т. 3, № 5. — С. 74–82.
  8. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.
  9. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
  10. Сахно Л. А. Трансгенные растения семейства крестоцветных как продуценты ненасыщенных жирных кислот с длинной углеводной цепью// Биотехнология. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 9–18.
  11. Сахно Л. А. Вариабельность жирнокислотного состава рапсового масла: классическая селекция и биотехнология // Цитология и генетика. — 2010. — Т. 44, № 6. — С. 70–80.
  12. Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Чернявский Е. А. и др. Трансгенные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие цитохром P450<sub>SCC</sub>, в качестве потенциального биокатализатора синтеза прегнанов из стероидов// Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности. I Международная конференция Российского химического общества имени Д. И. Менделеева: Сб. тезисов докладов. — М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2009. — С. 176–177.
  13. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues// Anal. Biochem. — 1993. — V. 211. — P. 139–143.
  14. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.
  15. Vigeolas H., Waldek P., Zank T., Geigenberger P. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by overexpression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter // Plant Biotech. J. — 2007. — V. 5, N 3. — P. 431–441.
  16. Yu B., Lydiate D. J., Young L. W. et al. Enhancing the carotenoid content of Brassica napus seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // Transgenic Res. — 2008. — V. 17, N 4. — P. 573–585.
  17. Tan H., Yang X., Zhang F. et al. Enhanced Seed Oil Production in Canola by Conditional Expression of *Brassica napus* *LEAFY* *COTYLEDON1* and *LEC1-LIKE* in Developing Seeds// Plant Physiol. — 2011. — V. 156, N 7. — P. 1577–1588.
  18. Stoutjesdijk P. A., Hurlestone C., Singh S. P., Green A. G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous  $\Delta 12$ -desaturase// Biochem. Soc. Transact. — 2000. — V. 28, N 6. — P. 938–940.
  19. Scarth R., McVetty P. B. E. Designer oil canola — a review of new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types// In: Proc. 10<sup>th</sup> Int. Rapeseed Cong., Canberra, Australia. — 1999. — P. 57.
  20. Vilkki J. P., Tanhuanpää P. K. Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland // Proc. 9<sup>th</sup> Int. Rapeseed Cong., Cambridge, UK. — 1995. — P. 386–388.
  21. Scarth R., Tang J. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches // Crop. Sci. — 2006. — V. 46. — P. 1225 — 1236.
  22. Knutzon D. S., Thompson G. A., Radke S. E. et al. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1992. — V. 89. — P. 2624–2628.
  23. Liu J.-W., DeMichele S., Bergana M. et al. Characterization of oil exhibiting high  $\gamma$ -linolenic acid from a genetically transformed canola strain // J. Amer. Oil Chem. Soc. — 2001. — V. 78, N 5. — P. 489–493.
  24. Ursin V. M. Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids// J. Nutr. — 2003. — V. 133. — P. 4271–4274.
  25. Stefansson B. R., Hougén F. W., Downey R. K. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid // Can. J. Plant. Sci. — 1961. — V. 41. — P. 218–219.
  26. Stefansson B. R., Downey R. K. Rapeseed // In: Harvest of gold: the history of field crop breeding in Canada (Slinkard A. R., Knott D. R. (eds): Univ. Ext. Press, Univ. Of Saskatchewan, Saskatoon. — 1995. — P. 140–152.
  27. Murphy D. J. Molecular breeding strategies for the modification of lipid composition // In Vitro Cell Dev. Biol. — Plant. — 2006. — V. 42. — P. 89–99.
  28. Schröder-Pontoppidan M., Skarzhinskaya M., Dixelius C. et al. Very long chain and hydroxylated fatty acids in offspring of somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri*// Theor. Appl. Genet. — 1999. — V. 99, N 1–2. — P. 108–114.
  29. Nath U. K., Wilmer J. A., Wallington E. J. et al. Increasing erucic acid content through combination of endogenous low polyunsaturated fatty acids alleles with *Ld-LPAAT+ Bn-fae1* transgenes in rapeseed (*Brassica napus* L.) // Theor. Appl. Genet. — 2009. — V. 118. — P. 765–773.

**ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ  
СЕМЯН РАПСА С ТРАНСГЕНОМ *CYP11A1*  
ЦИТОХРОМА P450<sub>SCC</sub>**

*Л. А. Сахно*<sup>1</sup>  
*А. Н. Остапчук*<sup>2</sup>  
*В. В. Клочко*<sup>2</sup>  
*Н. В. Кучук*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

*E-mail: sakhno@icbge.org.ua*

С использованием газовой хромато-масс-спектрометрии проанализирован качественный и количественный состав жирных кислот семян растений рапса *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., выращенных в условиях закрытого грунта, с введенным путем агробактериальной трансформации геном *cyp11A1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> крупного рогатого скота (*Bos primigenius taurus* L.). Показано, что экспрессия гетерологического гена под конститутивным (35S) промотором не влияла на общее количество жирных кислот в семенах, но приводила к количественным изменениям в их составе. Во втором поколении трансгенных линий наблюдали повышение максимально на 6% (до 72,67 моль%) количества олеиновой и уменьшение почти вдвое (до 3,89 моль%) количества линоленовой кислоты. Проведенные эксперименты позволяют более полно охарактеризовать созданные трансгенные линии рапса, для которых ранее показано увеличение количества суммарного растворимого протеина в листьях и семенах, повышение антиоксидантной активности тканей листа, увеличение активности супероксиддисмутазы при прорастании семян, сокращение периода вегетативного развития на 5–7 суток и устойчивость к обработке гербицидами на основе фосфинотрицина.

**Ключевые слова:** *Brassica napus*, *cyp11A1*, газовая хроматография, жирные кислоты, рапс, цитохром P450<sub>SCC</sub>.

**FATTY ACID OIL COMPOSITION  
OF CANOLA CARRYING CYTOCHROME  
P450<sub>SCC</sub> *CYP11A1* TRANSGENE**

*L. O. Sakhno*<sup>1</sup>  
*A. M. Ostapchuk*<sup>2</sup>  
*V. V. Klochko*<sup>2</sup>  
*M. V. Kuchuk*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: sakhno@icbge.org.ua*

Using gas chromatography-mass spectrometry, qualitative and quantitative composition of fatty acids from transgenic rape *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. seeds was analyzed. The plants carrying bovine (*Bos primigenius taurus* L.) cytochrome P450<sub>SCC</sub> *cyp11A1* gene due to agrobacterium transformation were grown under greenhouse conditions. It was shown that heterologous gene expression under constitutive (35S) promoter did not affect on total fatty acid content in seeds but resulted in quantitative changes in their composition. Second transformant generation was characterized by increasing of quantity of oleic acid on 6% (maximum up to 72.67 mol%) and decreasing of linolenic acid almost in half (up to 3.89 mol%). Our experiments give the possibility to describe more completely the obtained transgenic canola lines, which previously demonstrated increasing of total soluble protein in the leaves and seeds, increasing of antioxidant activity of leaf tissue, increasing activity of the superoxide dismutase during germination of seeds, decreasing of the period of vegetative development by 5–7 days and resistance for herbicide phosphinotricin treatment.

**Key words:** *Brassica napus*, *cyp11A1*, gas chromatography, fatty acids, rape, cytochrome P450<sub>SCC</sub>.