

биоразнообразия растительного мира / Под ред. А.С. Демидова; отд. биол. наук РАН, Сов. Бот. садов России.— Белгород: Изд-во БелГУ.— 2008.— 332 с.

2. Ботанический сад Московского университета. 1706–2006. Первое научное ботаническое учреждение России / Под ред. В.С. Новикова, М.Г. Пименова, К.В. Киселевой, В.Е. Гохмана, А.Ю. Паршина.— Москва: Товарищество научных изданий КМК.— 2006.— 280 с.

3. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.16. Биология.— 2002, №4.— С. 8–14.

4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*—1962.— Vol.15, №2.— P. 473–497.

Резюме

В последние годы для сохранения биоразнообразия растений успешно используются методы культуры *in vitro*. Усовершенствована технология ускоренного размножения сортов сирени обыкновенной. Показана возможность получения регенерантов посредством прямого органогенеза, отмечены особенности морфогенеза *in vitro*.

В останні роки для збереження біорозмаїття рослин успішно використовуються методи культури *in vitro*. Удосконалена технологія прискореного розмноження сортів бузку звичайної. Показана можливість одержання регенерантів за допомогою прямого органогенезу, відзначені особливості морфогенезу *in vitro*.

In vitro techniques have found increasing use in protection of plant biodiversity in recent years. Technology of express propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars *in vitro* is improved. The possibility of obtaining the regenerants via direct organogenesis is showed, the peculiarities of morphogenesis *in vitro* being revealed.

**ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, САХНО Л.А.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹,
СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, КЛОЧКО В.В.², ОСТАПЧУК А.Н.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.³**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
ул. Заболотного, 148, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: ysheludko@ukr.net

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 152, г. Киев, 03680, Украина

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, г. Москва,
119991, Россия

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В РАСТЕНИЯХ

Изучение механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды и создание новых устойчивых форм методами генетической инженерии является актуальной задачей биотехнологии в усло-

виях глобальных климатических изменений и увеличивающегося загрязнения окружающей среды. Одним из механизмов адаптации растений к холоду является увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах, обеспечивающее необходимую текучесть мембран при пониженных температурах. Катализируют реакции десатуразы жирных кислот [1–3].

С целью исследования механизмов функционирования белково-липидных мембранных систем в условиях холодового стресса и получения растений с новыми признаками мы сконструировали ряд генетических экспрессионных векторов, несущих гетерологические гены ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (нативные или слитые с репортерным геном термостабильной лишайницы из *Clostridium thermocellum* [4]). Проведена генетическая трансформация модельного объекта (*Nicotiana tabacum*) и ценного сельскохозяйственного вида (*Brassica napus*), и доказано присутствие трансгена в полученных растениях. Анализ активности термостабильной лишайницы позволил отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевых генов. Для ряда полученных линий трансгенных растений показано изменения спектра жирных кислот мембранных липидов и повышенную устойчивость к холодовому стрессу.

Материалы и методы

Нативные и гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC* *S. vulcanus* и *desA* *Synechocystis* sp. PCC 6803 были помещены под контроль промотора 35S РНК ВМЦК в генетические конструкции рBISN-*desC*, рBISN-*desA*, рBISN-*desC-licBM3* и рBISN-*desA-licBM3*, содержащие ген *nrpII* в качестве селективного [5, 6]. Ген *desC* под контролем промотора 35S РНК ВМЦК и терминатора нопалинсинтазы был помещен в генетическую конструкцию рСВ141, содержащую селективный ген *bar* под контролем промотора нопалинсинтазы и терминатора октопинсинтазы на основе вектора рICН5290 [7]. Для генетической трансформации были использованы аseptические растения *Nicotiana tabacum* сорта Wisconsin и рапса (*Brassica napus*) сортов Магнат и Обрий, которые выращивали *in vitro* на агаризованной среде MS [8]. Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Листовые экспланты растений табака и рапса кокультивировали с суспензией агробактерий. Экспланты табака помещали на среду MS для регенерации, содержащую 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) [9]. Экспланты рапса культивировали на среде MS для каллусогенеза, содержащей 2 мг/л 2,4-D, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л кинетин и 0,1 мг/л БАП, затем переносили на среду MS для регенерации, содержащую 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л НУК, 1 мг/л гибберелловой кислоты, 1 мг/л абсцизовой кислоты [10]. Для отбора растений-трансформантов в питательные среды добавляли канамицин (100 мг/л) при трансформации с использованием генетических конструкций рBISN-*desC*, рBISN-*desA*, рBISN-*desC-licBM3* и рBISN-*desA-licBM3*, или фосфинотрицин (5 мг/л) при трансформации с использованием генетической конструкции рСВ141.

Присутствие трансгена и анализ активности термостабильной лихеназы в клетках отобранных линий растений проводили в соответствии с описанными протоколами [11]. Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили по методике [12]. Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (J&W Scientific). Температурная программа от 150 °С до 220 °С с градиентом 2 °С/мин, температура испарителя — 250 °С. 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).

Контрольные и опытные растения подвергали воздействию низких температур: помещали в камеру при 0 °С, после чего опускали температуру до –5 °С и выдерживали 30 минут. Экстрагировали листовую ткань. Содержание малонового диальдегида и перекиси водорода в экстрактах контрольных и трансгенных растений в нормальных и стрессовых условиях измеряли с использованием методов [13].

Результаты и обсуждение

Генетическая трансформация растений табака была проведена методом культивирования с линиями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущими генетические вектора pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, содержащие нативные и гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC S. vulcanus* и *desA Synechocystis* sp. PCC 6803, слитые в одной рамке считывания с геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*, под контролем промотора 35S РНК ВМЦК. После регенерации устойчивых растений на питательной среде, содержащей канамицин, присутствие в них перенесенных генов было доказано методом мультиплексной ПЦР [11].

В растениях табака, трансформированных гибридными генами десатураз, активность репортерного белка была обнаружена в 11 из 19 растений с геном *desC-licBM3* и в 2 из 5 растений с геном *desA-licBM3* [11]. Растения табака двух линий, экспрессирующие гибридный ген *desA-licBM3*, были повторно трансформированы векторной конструкцией pCB141, несущей нативный ген *desC* под контролем 35S промотора ВМЦК. После селекции на среде с фосфинотрицином были отобраны 20 растений, у которых было показано присутствие обоих целевых генов. Шесть из них были использованы для проверки активности термостабильной лихеназы в составе гибридного белка, которая была показана во всех случаях. Кроме того было отобрано 5 растений, несущих нативный ген *desC* — D9-десатураза; 5 растений с нативным геном *desA* — D12-десатураза [11]. Активность лихеназы была зарегистрирована в двух линиях рапса (сорт Обрий), которые были регенерированы на селективной среде, содержащей фосфинотрицин, после трансформации одновременно двумя конструкциями: pBISN-*desC-licBM3* и

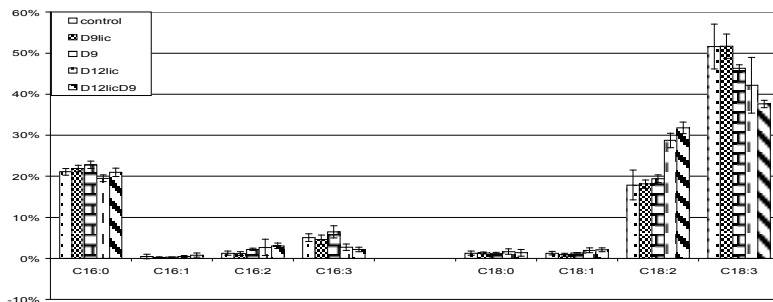


Рис. Соотношение жирных кислот в мембранах трансгенных линий *N. tabacum*. В качестве контроля использованы нетрансгенные растения табака

рСВ133 (ген устойчивости к раундапу и селективный ген устойчивости к фосфинотрицину).

Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии анализировали соотношение жирных кислот в экстрактах липидов клеточных мембран трансгенных растений табака. Было проанализировано 19 линий растений. Наибольшие отличия от контроля наблюдали у растений, содержащих ген *desA-licBM3* и у двойных трансформантов, которые содержали гены *desA-licBM3* и *desC* (рис.). Соотношение ненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах растений данных линий было смещено в сторону накопления двуненасыщенной линолевой кислоты, которая, считается, обуславливает устойчивость клеток к воздействию холода [1, 2].

Для оценки устойчивости растений к холоду определяют показатели окислительного повреждения клетки и измеряют уровень специфических метаболитов, содержание которых связано со стрессовым разобщением мембранных электронтранспортных цепей и появлением в клетке реакционно-активных форм кислорода. Одной из таких форм является пероксид водорода. Вместе с супероксид-анионом и гидроксил-радикалом, это вещество принимает участие в реакциях перекисного окисления липидов — одной из первых мишеней холодового стресса. Поэтому в ходе нашей работы мы исследовали содержание пероксида водорода и накопление основного продукта окисления липидов (малонового диальдегида) в растениях контрольных и трансгенных линий в нормальных условиях и условиях холодового стресса. Обнаружено отличие между содержанием обоих веществ в ряде трансгенных линий растений и контрольных линий. Показано, что некоторые трансгенные растения, которые экспрессируют гены десатураз $\Delta 9$ и $\Delta 12$, в условиях холодового стресса накапливают пероксид водорода и малоновый диальдегид в тех же количествах, что и контрольные растения, которые не подвергались холодовой обработке.

Выводы

Проведена генетическая трансформация *Nicotiana tabacum* и *Brassica napus* генами ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и

desA (D12) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (нативные или слитые с репортерным геном термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum*) и доказаны присутствие и экспрессия трансгена в полученных растениях. Для ряда полученных линий трансгенных растений табака показаны изменения спектра жирных кислот мембранных липидов в сторону накопления двуненасыщенной линолевой кислоты и повышенная устойчивость к холодовому стрессу.

Работа выполнялась в рамках совместного российско-украинского проекта "Изучение механизмов устойчивости высших растений к абиотическим стрессам благодаря гетерологической экспрессии генов цианобактерий", грант РФФИ 2008–2009 №08-04-90410_укр (тема №П-16-09, номер гос. регистрации УНТЦ 0108U003265).

Литература

1. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии.— 2001.— **41**: 163–198.
2. Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // Biochimica et Biophysica Acta.— 2004.— **1666**: 142–157.
3. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters.— 2006.— **580**: 5477–5483.
4. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирюзян Э.С. Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы *Clostridium thermocellum*, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов // Молекулярная биология.— 2002.— **36**(4): 868–876.
5. Маали Р., Шимишлашвили Х.Р., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Носов А.М., Лось Д.А., Голденкова-Павлова И.В. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной Δ^9 -десатуразы в бактериях *Escherichia coli* // Генетика.— 2007.— **43**(2): 1–7.
6. Maali A.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. Acyl-lipid D12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologija.— 2007.— **53**: 4–7.
7. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // Nat. Biotechnol.— 2005.— **23**: 718–723.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— **15**: 473–497.
9. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. Inheritance of functional foreign genes in plants // Science.— 1984.— **223**: 496–498.
10. Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях // Цитология и генетика.— 2008.— **42**(1): 16–22.
11. Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Синдаровская Я.Р., Шимишлашвили Х.Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Информационный Вестник ВОГиС.— 2010.— **14**(1): (в печати).
12. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // Analytical Biochemistry.— 1993.— **211**: 139–143.

13. Дёмин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена *desA* D12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией (2008) Физиология растений.— 55: 710–720.

Резюме

Были сконструированы вектора для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений генами десатураз цианобактерий, участвующими в процессах адаптации организма к холодовому стрессу, слитыми с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*, и проведена генетическая трансформация растений табака и рапса. У полученных растений исследовали изменения спектра жирных кислот мембранных липидов и резистентность мембран к холодовому стрессу.

Було сконструйовано вектори для *Agrobacterium*-опосередкованой трансформациі рослин генами десатураз ціанобактерій, що беруть участь у процесях адаптації організму до холодового стресу, злитими з репортерним геном термостабільної ліхенази з *Clostridium thermocellum*, і проведено генетичну трансформацію рослин тютюну і рапсу. Для отриманих рослин досліджено зміни спектру жирних кислот мембранных ліпідів і резистентність до холодового стресу.

Plasmid constructs for *Agrobacterium*-mediated transformation of plant nuclear genome with cyanobacterium desaturase genes responsible for cold stress adaptation fused with reporter *Clostridium thermocellum* lichenase gene were built up and used to obtain transgenic plants of tobacco and rape. Lipid fatty acid spectrum change and cold stress tolerance was studied for obtained transgenic plants.

ЩЕРБАК Н.Л., САХНО Л.А., КОМАРНИЦКИЙ И.К.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03068, Киев, ул. Академика Заболотного, 148
e-mail: natasha@iicb.kiev.ua*

ИЗУЧЕНИЕ *LOX*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В наше время трансгеноз (перенос и реализация генетической информации) является направлением исследований, которые дают ответ на многочисленные фундаментальные вопросы. При изучении функционирования чужеродных генов в трансгенных растениях были охарактеризованы и исследованы механизмы регуляции экспрессии, идентифицированы новые промоторные и энхансерные последовательности. Методы геной инженерии, в частности *gene tagging*, также позволяют определять последовательности, регуляторный потенциал которых проявляется только в определенном генетическом окружении, критические (от англ. *cryptic*) промоторы. Критические регуляторные элементы обнаружены у разных организмов, как в