

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

непосредственной близости возле кодирующего участка генов, так и в не-транскрипционных последовательностях генома [1–3]. В геноме табака выявили криптический промотор, который обеспечивал экспрессию гена в покровных тканях семян [4], а также конститутивный криптический промотор *tCUP* [5], активность которого подтвердилась при трансформации растений табака и арабидопсиса [6].

Мы в нашей работе также столкнулись с ситуацией, когда экспрессия гена происходила под влиянием последовательности, которая не имеет традиционной для промоторов структуры и обеспечивает экспрессию только в определенном окружении. Но, в отличие от криптических промоторов, эта последовательность не является геномной ДНК растений. В наших экспериментах в трансгенных растениях табака экспрессия беспромоторного гена *bar* происходила под влиянием *lox*-сайта бактериофага P1, размещенного в генетических конструкциях непосредственно возле правого бордера Т-ДНК (*RB-lox-bar*-). Для трансформации были использованы вектора, которые содержат *lox*-сайт и ген *bar* без промотора возле правого бордера Т-ДНК, а также ген *nptII* под контролем *pos* промотора. Трансгенные растения были отобраны по устойчивости к антибиотику канамицину. При тестировании этих растений на селективной среде, которая содержит фосфинотрицин, было установлено, что большинство трансформированных растений (около 80%) устойчивы к этому гербициду [7]. Такой результат был довольно неожиданным, но дальнейшие эксперименты подтвердили, что размещение *lox*-сайта в генетических конструкциях возле *RB* обуславливает стабильную экспрессию следующего за ним беспромоторного гена *bar*. О наличии экспрессии свидетельствовала устойчивость трансгенных растений к гербициду фосфинотрицину, а также наличие соответствующей мРНК в тотальной РНК растений. *Lox*-опосредованная экспрессия зависит от способа внесения Т-ДНК в растительный геном и происходит только в трансгенных растениях, полученных методом агробактериальной трансформации. Возможность *lox*-опосредованной экспрессии была показана на многих растительных видах. С помощью вышеупомянутых векторов были получены устойчивые к фосфинотрицину трансгенные растения таких сельскохозяйственно ценных видов, как рапс [8], картофель и свекла (неопубликованные данные).

Целью наших дальнейших исследований было изучить возможность *lox*-опосредованной экспрессии при размещении *lox* сайта возле левого бордера, а также провести контрольный эксперимент с вектором, в котором последовательность *lox*-сайта заменена на АТ богатую последовательность ДНК.

### **Материалы и методы**

*Плазмиды и бактериальный штамм.* Векторные конструкции pICH3737 и pICBV19 были любезно предоставлена компанией Icon Genetics GmbH (г. Халле, Германия). Вектор pCB108 является производным вектора

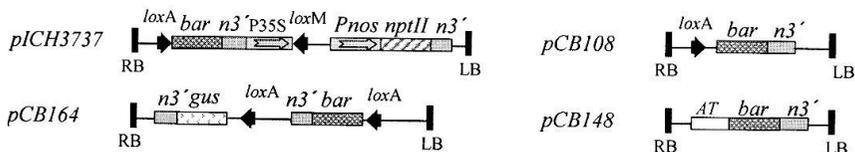


Рис. Схема Т-ДНК плазмидных векторов

pICH3737 и получен в результате делеции *XhoI/EheI* фрагмента этого вектора. Из вектора pCB108 *loxA* сайт вырезали рестриктазами *BamHI/Ecl136II* и проводили инсерцию AT богатой последовательности, которая была амплифицирована из межгенного спейсера *psbA-petB* хлоропластной ДНК табака. Вектор pCB164 является производным вектора pICBV19, и содержит *loxA* сайт между левым бордером и кодирующей последовательностью *bar* гена. Плазмидные вектора были использованы для трансформации *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101). Культивирование агробактерии проводили как описано в [7].

**Агробактериальная трансформация растений.** Для генетической трансформации табака использовали листья асептических растений сорта Dubec и Wisconsin. Трансформацию проводили методом сокультивации листовых дисков табака с агробактерией на жидкой среде MS в течении суток, после чего экспланты переносили на агаризованную среду MS, содержащую 1,0 мг/л ВАР, 0,1 мг/л NAA, а также фосфинотрицин 5 мг/л и цефотаксим 600 мг/л. Укоренение растений проводили на среде MS, содержащей фосфинотрицин 5 мг/л, цефотаксим 200 мг/л.

Анализ трансгенных растений с помощью ПЦР проводили как описано в [7].

### Результаты и обсуждение

Для определения возможности *lox* опосредованной экспрессии при размещении *lox* сайта возле левого бордера был сконструирован вектор pCB164. В векторе pCB148 *lox* сайт возле правого бордера был заменен на AT богатую последовательность межгенного спейсера хлоропластной ДНК. Идея создания этого вектора возникла, поскольку последовательность *lox* сайта является AT богатой, и нам было интересно сравнить влияние на экспрессию трансгена *lox* сайта и произвольно выбранной AT богатой последовательности, размещенной в векторе аналогичным образом. Вектор pCB108 содержит *lox* сайт возле правого бордера и не содержит других селективных генов, а также других промоторов, которые могут быть энхансерами для *lox* опосредованной экспрессии. На наш взгляд, эта конструкция интересна тем, что дает возможность получать устойчивые к гербициду растения, привнося в геном минимум чужеродной генетической информации.

В результате экспериментов по трансформации растений табака были получены трансгенные растения, устойчивые к гербициду фосфинотрицину,

**Эффективность регенерации растений табака на селективной среде, после трансформации конструкциями, содержащими *lox* сайт вблизи от бордеров Т-ДНК**

Конструкция	Количество эксплантов	Эффективность регенерации, %
pICH3737/RB- <i>lox-bar</i> /	20	77±2,79
pCB108/RB- <i>lox-bar</i> /	20	18±3,80
pCB164/LB- <i>lox-bar</i> /	20	28±2,79
pCB148/RB-AT- <i>bar</i> /	20	0±0,00

\* Эффективность регенерации оценивали как соотношение количества эксплантов, дающих зеленые побеги на селективной среде, к общему количеству эксплантов в эксперименте. Эффективность регенерации представлена как средняя величина, полученная по результатам трех независимых экспериментов по трансформации.

со всеми вышеупомянутыми конструкциями, кроме вектора pCB148. После сокультивации с агробактерией, экспланты переносили на среду для регенерации, содержащую селективный агент фосфинотрицин в концентрации 5 мг/л. Количество эксплантов, активно регенерирующих на селективной среде, значительно варьировало для каждой конструкции. Тогда как отобранные на селективной среде растения практически все укоренились, и методом ПЦР была подтверждена их трансгенная природа. Учитывая эти данные, мы посчитали, что вполне корректно и при этом более информативно для оценки *lox* опосредованной экспрессии, сравнить частоту регенерации растений на селективной среде. Данные представлены в таблице.

Трансгенные растения табака pCB108 были высажены в грунт в условиях теплицы. Обработка тепличных растений гербицидом BASTA (действующее вещество — фосфинотрицин) подтвердила устойчивость этих растений к гербициду. В результате самоопыления были получены семена трансгенных растений, проростки которых при анализе *in vitro* на устойчивость к фосфинотрицину показали расщепление 3:1 по этому признаку.

### **Выводы**

Были получены трансгенные растения табака, в которых экспрессия беспромоторного гена *bar* происходила под влиянием *lox* сайта вблизи от левого бордера Т-ДНК. Также была показана возможность *lox* опосредованной экспрессии гена *bar* у растений, трансформированных вектором pCB108, не содержащим дополнительных селективных генов и каких-либо промоторов. И хотя эффективность трансформации по сравнению с исходной плазмидой pICH3737 была значительно ниже, экспрессия *bar* гена в полученных трансгенных растениях была стабильной и сохранялась в поколении T1.

### **Литература**

1. Karoun A.M., Kaufman T.C. A functional analysis of 5' intronic and promoter regions of the homeotic gene proboscipedia in *Drosophila melanogaster* // Development.— 1995, Jul; 121(7): 2127–41.

2. *Irniger S., Egli C.M., Kuenzler M., Braus G.H.* The yeast actin intron contains a cryptic promoter that can be switched on by preventing transcriptional interference // *Nucleic Acids Res.*— 1992, Sep. 25; 20(18): 4733–9.

3. *Palmer C.N., Hsu M.H., Muerhoff A.S. et al.* Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter. *J. Biol Chem.*— 1994, Jul 8; 269(27): 18083–9.

4. *Fobert P.R., Labbe H., Cosmopolous J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Iyer V.N., Miki B.L.* T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant J.*— 1994.— 6: 567–577.

5. *Foster P.R., Hattori J., Labbe H., Ouellet T., Fobert P.R., James L.E., Iyer V.N., Miki B.L.* A tobacco cryptic constitutive promoter, *tCUP*, revealed by T-DNA tagging. *Plant. Mol. Biol.*— 1999.— 41: 45–55.

6. *Wu K, Malik K, Tian L, Hu M. et al.* Enhancers and core promoter elements are essential for the activity of a cryptic gene activation sequence from tobacco, *tCUP*. *Mol Genet Genomics.*— 2001, Jul; 265(5): 763–770.

7. *Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Гецко И.О. и др.* Изучение влияния *lox*-сайтов Cre *lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях // *Цитология и генетика.*— 2006.— 1.— С. 3–9.

8. *Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В.* Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса // *Цитология и генетика.*— 2008.— Т.42, №1.— С. 21–28.

## Резюме

Последовательность *lox* сайта бактериофага P1 была использована нами в векторах для трансформации растений и изучено её влияние на экспрессию беспромоторного *bar* гена при размещении *lox* сайта возле правого (RB) или левого (LB) бордеров T-ДНК, вблизи от сайта инициации транскрипции. *Lox* опосредованная экспрессия *bar* гена, распознаваемая по устойчивости трансгенных растений к гербициду фосфинотрицину, наблюдалась у растений, полученных в результате трансформации векторами обоих типов.

Послідовність *lox* сайту бактеріофагу P1 була використана у векторах для трансформації рослин та вивчено її вплив на експресію безпромоторного *bar* гену при розміщенні *lox* сайту біля правого (RB) або лівого (LB) бордеру T-ДНК. *Lox* опосередкована експресія *bar* гену, що розпізнавалася завдяки стійкості трансгенних рослин до гербициду фосфінотрицину, спостерігалась у рослин, які були трансформовані конструкціями обох типів.

*Lox* sites of the Cre/*lox* recombination system from bacteriophage P1 were analyzed for their ability to influence of *bar* gene expression in transgenic plants when inserted upstream from a gene coding sequence adjacent to the right border and left border of T-DNA. *Lox*-mediated expression of *bar*-gene, recognized by resistance to PPT of transgenic plants, was permanent and occurred in plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation with both type of vectors: containing *lox* site near RB and LB of T-DNA.

**BORISJUK N.V.<sup>1</sup>, ANDRIANOV V.<sup>1</sup>, POGREBNIYAK N.<sup>1</sup>, BRINKER A.<sup>2</sup>,  
DIXON J.<sup>2</sup>, FLYNN J.<sup>1</sup>, MATYSZCZUK P.<sup>1</sup>, ANDRYSZAK K.<sup>1</sup>, LAURELLI M.<sup>1</sup>,  
SPITSIN S.<sup>1</sup>, GOLOVKIN M.<sup>1</sup>, KOPROWSKI H.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Biotechnology Foundation Laboratories, Thomas Jefferson University,  
1020 Locust Street, Philadelphia, PA 19107, USA. E-mail: NBorsisjuk@gmail.com*

*<sup>2</sup>Dept. of Nutritional Sciences and Rutgers Center for Lipid Research,  
Rutgers University, 96 Lipman Drive, New Brunswick, NJ 08901, USA*

## **METABOLIC ENGINEERING OF PLANT BIOMASS PRODUCTION OF BIOFUEL**

Uncertainties of fossil oil supplies and growing demand for energy provoked a surge of interest in renewable energy resources and greatly stimulated intense academic and applied research on biofuel, plant-derived ethanol and oil [1, 2]. Ethanol has been traditionally produced by fermentation plant produced sugars (sugarcane, sugar beet) and starch (corn, potato). A lot of efforts and resources are currently directed to develop second generation technologies for ethanol production from the lignocellulosic materials which compose the majority of plant biomass [3]. Another challenge lies in the efficient production of biodiesel fuels based on plant oils [4].

Biodiesel production is usually associated with seeds of selected plant species, such as sunflower, soybean, rapeseed or jatropha, which accumulate oil in the form of triacylglycerols (TAGs) as storage reserves. While the oil content can reach 40–50% of seed dry weight, the yields of oil-rich seeds are rather limited. Despite accumulation in seeds, primary lipid synthesis occurs in green photosynthetic tissues, leaves and stems [5], which constitute a significantly larger portion of plant biomass than seeds. A number of recent studies indicated that gene manipulations enable the relocation or elevation of oil storage in alternative plant organs such as roots, stems or leaves making the green biomass a plausible system for manufacturing biodiesel [6, 7]. It is well documented that enhanced expression of some enzymes involved in lipid metabolism can lead to increased oil accumulation in different plant organs [5, 6]. The second set of published data relates to channeling oil accumulation to leaf tissues by leaf-specific expression of genes coding for transcription factors that regulate seed development and maturation. When constitutively expressed in leaves, some of transcription factors, e.g. LEC1, LEC2 or WR11, induced the formation of seed-like structures and stimulated oil synthesis in the vegetative green tissues [8].

In an attempt to investigate the potential of plant biomass as a new source of biodiesel oil, we chose tobacco, a plant that has been widely used in genetic engineering experiments. Tobacco, a well-established industrial crop used primarily for non-food consumption, is widely cultivated in more than 100 countries worldwide, yielding up to 170 tons per hectare of green tissues when grown for biomass production instead of smocking [9]. Analysis of leaves from 56 tobacco species revealed that the average content of extractable fatty acids (FA), which is the major component of biodiesel fuel, is about 3% per dry weight [10]. While