11. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, №10. – P. 490–498.
12. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress- and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 838-853.
13. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced H_2O_2 is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61, №4–5. – P. 733–74610.
14. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schöffl F. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // J Exp Bot. – 2003. – Vol. 54, №391. – P. 2343-9.
15. Yruela I. Copper in plant // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 145-156.

KASIJANCHUK R.M., VOLKOV A.R., PANCHUK I.I.
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str. 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

EFFECT OF SUCROSE ON *APX* mRNA LEVELS UPON HEAVY METAL STRESS

Aim. In order to clarify molecular mechanisms of heavy metal stress response in plants expression of eight genes coding for ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes induced by iron and copper ions in leaf tissues of *Arabidopsis thaliana* was evaluated. ***Methods.*** Changes of mRNA levels were estimated using quantitative real-time RT-PCR. ***Results***. It was found that mRNA levels of several genes (especially that of *Apx1* and *sApx*) were increased after 12 hours of treatment. Comparison of our novel and recently obtained results showed that after incubation of leaves in the buffer, which contains sucrose, the mRNA levels were the same or higher than after application of buffer without sucrose. ***Conclusions***. The data indicate that the presence of sucrose in incubation buffer enhances *Apx* mRNA levels. We speculate that sucrose may serve as a source of energy required for effective transcription of *Apx* genes upon stressful conditions.
Key words: Arabidopsis thaliana, copper, iron, sucrose, abiotic stress, *Apx*, gene expression.

КИРПА Т.Н.[1], РУДАС В.А.[1], ОВЧАРЕНКО О.А.[1], КЛЕБАНОВИЧ А.А.[1], ГЕРАСИМЕНКО И.М.[1], ИВАННИКОВ Р.В.[2], ОСТАПЧУК А.Н.[3], ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.[4], ШЕЛУДЬКО Ю.В.[1]
[1]Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net
[2]Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины
Украина, 01014, г. Киев, ул. Тимирязевская 1
[3]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 152
[4]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
РФ, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35

ГЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ Δ9-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ В ОРХИДЕЕ *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F

Создание растений, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, является одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед современной биотехнологией. Это обусловлено растущими рисками климатических изменений, загрязнением окружающей среды и эрозией пахотных земель. Важным фактором, определяющим толерантность растительной клетки к температурному и осмотическому стрессам, является жирнокислотный состав клеточной мембраны. Это обусловлено тем, что при переходе липидного бислоя из жидкокристаллического состояния в фазу геля нарушается функционирование мембранных ферментных комплексов. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран у растений увеличивает их текучесть и приводит к понижению температуры фазового перехода, что коррелирует с холодостойкостью растений [1].

Ферментами, отвечающими за введение двойных связей в углеводородные цепочки жирных кислот, являются десатуразы. Гетерологическая экспрессия генов десатураз позволяет изменить спектр жирных кислот мембранных липидов [2]. У высших растений синтез нена-

сыщенных С-16 и С-18 жирных кислот начинается с введения двойной связи в позиции Δ9 и локализуется в пластидах, хотя существуют сообщения о клонировании генов ацил-липидных Δ9-десатураз предположительно непластидной локализации [3 и литература, цитируемая в 3]. Последующие реакции десатурации могут происходить или в пластидах, или в эндоплазматическом ретикулюме [3]. Поскольку именно биосинтез мононенасыщенных жирных кислот играет ключевую роль в изменении спектра мембранных липидов, обеспечивая субстрат для дальнейшей десатурации, можно предположить, что данная реакция определяет и адаптацию клеток к холодовому стрессу. С целью изучения механизмов биосинтеза жирных кислот и получения холодостойких растений нами была проведена генетическая трансформация *Dendrobium linguella* – популярного для оранжерейного и комнатного выращивания вида, относящегося к семейству орхидных (Orchidaceae), геном ацил-липидной десатуразы *desC* (Δ9) цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. Использование экспрессионно-репортерной системы, обеспечивающей слияние гена десатуразы в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum* (*licBM3*) [4], позволило отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевого гена. Анализ спектра жирных кислот мембранных липидов в отобранных линиях показал уменьшение доли насыщенной пальмитиновой кислоты и увеличение доли С18:3 линоленовой кислоты, что свидетельствует о физиологической активности гетерологичной десатуразы в клетках орхидеи.

Материалы и методы

Гибридный ген *desC::licBM3* был размещён под контролем 35S промотора ВМЦК в бинарном векторе для агробактериальной трансформации, созданном на основе pBin19 и содержащем селективный ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрицину. Присоединение последовательности транзитного пептида малой субъединицы РУБИСКО *Arabidopsis thaliana* (*ats*1A) к гибридному гену *des*C::*lic*BM3 обеспечивало пластидную локализацию продукта. В качестве исходного материала для генетической трансформации использовали асептические вторичные протокормы *D. linguella* линии 534 (13) из коллекции Национального ботанического сада им. Н. Н. Гришко НАН Украины. Для генетической трансформации использовали методику Horsch et al. [5] с некоторыми модификациями: вторичные протокормы *D. linguella* переносили в пустые чашки Петри, разрезали их на сегменты 0,3-0,5 см и оставляли на свету. Через 7-10 суток сегменты смачивали разбавленной в 3 раза 10 mM $MgSO_4$ суспензией *A. tumefaciens* GV3101 pNPB14, активированной ацетосирингоном (200 мкМ). Сегменты вместе с агробактериальной суспензией помещали в вакуумную камеру (0,2 атм). Через 10-15 мин. сегменты подсушивали и оставляли на 7-10 суток в условиях рассеянного освещения. Всего было обработано около 4000 сегментов. Потом сегменты переносили на модифицированную питательную среду OrcR, содержащую макросоли ST [6], микросоли и Fe-хелат MS [7], витамины по Гамборгу [8], 20 г/л сахарозы, 50 мг/л гумата натрия, 200 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л морфолиноэтансульфоновой кислоты, 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и дополненную 500-600 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Через 2-3 недели культивирования растительные ткани переносили на питательную среду того же состава, дополненную 5 мг/л фосфинотрицина для селекции трансгенных линий. В процессе культивирования постоянно отбирали зеленые трансгенные линии.

Для проведения генетического анализа был использован метод мультиплексной ПЦР с четырьмя парами праймеров, позволяющий в ходе одной реакции определить присутствие целевых генов (десатуразы и термостабильной лихеназы), подтвердить качество изолированной для анализа ДНК и отсутствие агробактериальной контаминации [9].

Качественное определение активности термостабильной лихеназы проводили по протоколу [10]. Количественное определение активности фермента осуществляли по модифицированному методу [11], измеряя количество свободных восстанавливающих сахаров после реакции суммарных белковых экстрактов листовой ткани с лихенаном. Оптическую плотность растворов измеряли при 510 нм. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному для глюкозы. За единицу активности принимали активность фермента, образующего 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 с. Удельную активность рассчитывали на количество белка.

Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для хроматографического анализа проводили по методике [12] с незначительными модификациями. Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м×0,25мм×0,25мкм) (J&W Scientific). Температурная программа от 150°C до 220°C с градиентом 2°C/мин, температура испарителя - 250°C. В качестве газа-носителя 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).

Результаты и обсуждение

После генетической трансформации D. linguella через 6-7 месяцев культивирования было отобрано около 500 потенциально трансгенных клонов. Присутствие продукта экспрессии гибридного трансгена в клетках 18 из 28 исследованных линий было доказано методом качественного и количественного анализа активности термостабильной лихеназы (рис.1).

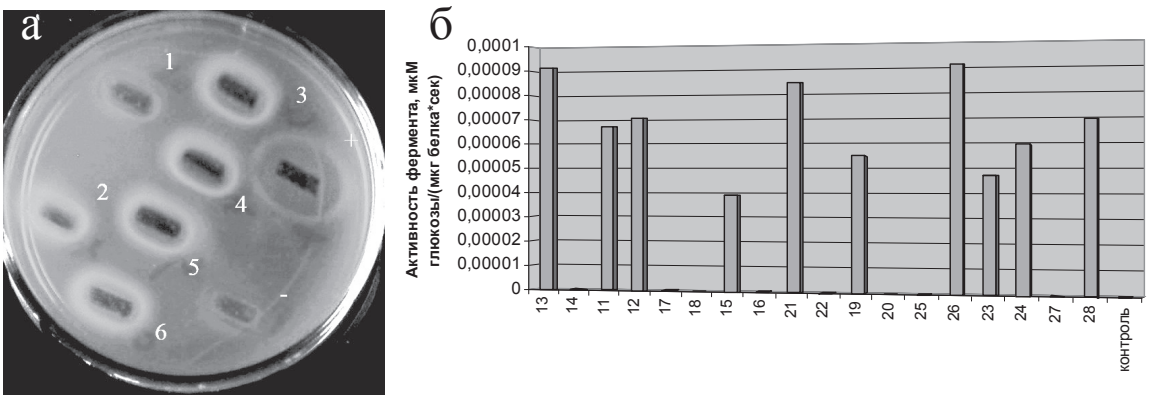

Рис. 1. Результаты качественного (**а**) и количественного (**б**) анализа активности термостабильной лихеназы в отселектиованных линиях растений. **а**) 1 – экстракт контрольного (нетрансгенного) растения *D. linguella*; 2-6) линии отселектированных после трансформации растений; "+" − *N. tabacum*, экспрессирующий ген термостабильной лихеназы; "-" − буфер для экстракции. Светлые участки вокруг лунок на чашке свидетельствуют о гидролизе лихенана. **б**) На графике показана активность термостабильной лихеназы в трансгенных линиях *D. linguella*, определяемая по количеству освобождённой из субстрата (лихенан) глюкозы на 1 мг суммарных растворимых белков за 1 секунду. "Контроль" – экстракт контрольного (не трансгенного) растения *D. linguella*

Для линий, в которых была показана активность термостабильной лихеназы, проведен генетический анализ присутствия трансгена в геноме растений методом МПЦР (Рис 2). Трансген был обнаружен во всех линиях орхидей, у которых была обнаружена лихеназная активность, что свидетельствует о высокой эффективности используемой экспрессионно-репортерной системы.

Таким образом, нами были отобраны линии трансгенных растений *D. linguella*, несущие гибридный ген *desC::licBM3* и демонстрировавшие активность термостабильной лихеназы. Дальнейшая работа включала исследование спектра жирных кислот мембранных липидов трансгенных линий. Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии анализировали соотношение жирных кислот в экстрактах липидов клеточных мембран трансгенных растений. Было проанализировано 6 линий орхидей, из которых четыре показывали высокую активность термостабильной лихеназы (линии 12, 13, 21 и 26), а в двух (линии 8 и 10) активность не была задетектирована методом чашечного теста. Наи-

большие отличия от контроля наблюдали у растений с высоким уровнем активности трансгена (линии 12, 13 и 26). Соотношение ненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах растений данных линий было смещено в сторону накопления триненасыщенной линоленовой кислоты (Рис. 3), которая, считается, обуславливает устойчивость клеток к воздействию холода [1, 3]. Также наблюдалось уменьшение доли содержания насыщенной олеиновой кислоты. Индекс ненасыщенности увеличивался в трансгенных линиях, достигая 1,59±0,13 в линии 26 по сравнению с 1,21±0,13 в контрольных растениях.

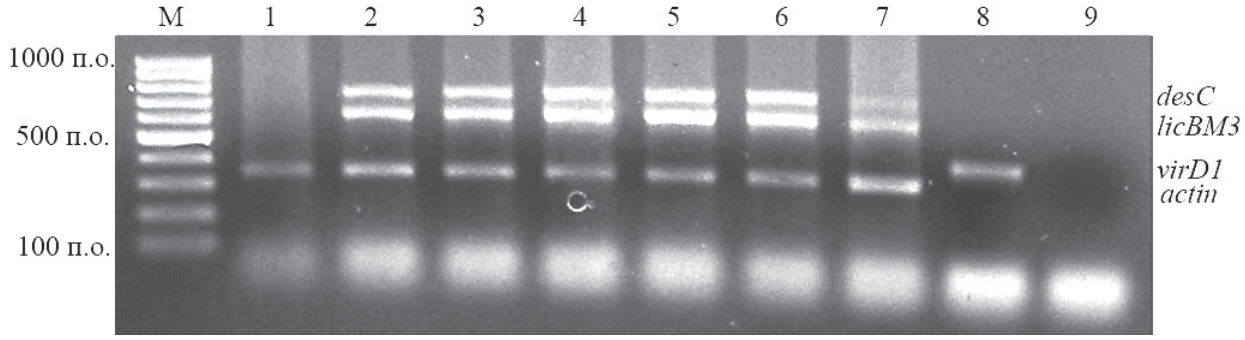

Рис. 2. Результаты МПЦР с ДНК орхидей DL534(13), трансформированных pNPB14, с использованием четырех пар праймеров (к генам *desC*, *licBM3*, *virD1* и актина). 1 – ДНК нетрансформированной орхидеи; 2-6 - ДНК орхидей, трансформированных pNPB14; 7 - ДНК *Nicotiana tabacum*, трансформированной pNPB14; 8 – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* GV3101; 9 - негативный контроль без ДНК; M – 100 bp ДНК маркер

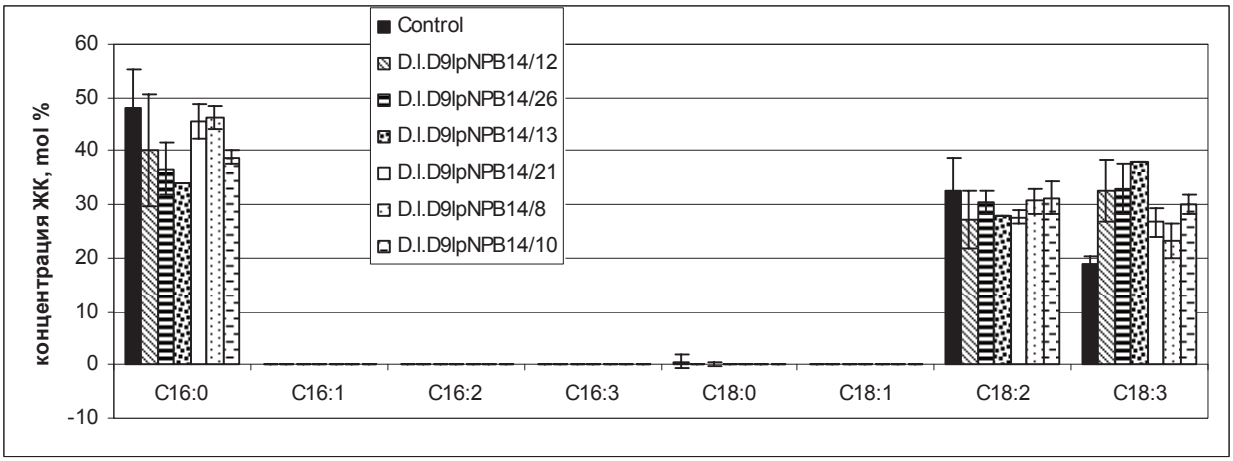

Рис 3. Соотношение жирных кислот в мембранах трансгенных линий *D. linguella.* В качестве контроля использованы нетрансгенные растения. На графике отмечено значение стандартного отклонения

Анализируя полученные результаты, следует отметить в первую очередь увеличение содержания C18:3 жирной кислоты в результате экспрессии десатуразы, отвечающей за введение первой двойной связи в позиции Δ9 и образование мононенасыщенных жирных кислот. Очевидно, что именно их количество является лимитирующим для дальнейших реакций, ведущих к формированию линоленовой кислоты. Уменьшение доли пальмитиновой кислоты, которая является одним из субстратов для Δ9-десатураз, на фоне отсутствия детектируемого количества других C16 жирных кислот позволяет предположить возможность участия её мононенасыщенного производного в биосинтезе линоленовой кислоты. Дальнейшая работа предполагает проведение физиолого-биохимического анализа полученных трансгенных растений с целью оценки их холодостойкости.

Выводы

Разработана методика культивирования *in vitro*, генетической трансформации, селекции и регенерации вторичных протокормов *D. linguella*. Получены линии трансгенных растений *D. linguella*, экспрессирующих гибридный ген Δ9-ацил-липидной десатуразы *desC::licBM3* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* с сигналом хлоропластного транспорта. Доказаны присутствие и экспрессия трансгена в полученных растениях, выделены линии с максимальным уровнем экспрессии гибридного гена. Для ряда полученных линий трансгенных растений показаны изменения спектра жирных кислот мембранных липидов в сторону накопления триненасыщенной линоленовой кислоты.

Работа выполняется при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006062.

Литература

1. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters. – 2006. – Vol. 580. – P. 5477–5483.
2. Thelen J.J., Ohlrogge J.B. Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants // Metabolic Engineering – 2002. – Vol. 4. – P. 12-21.
3. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии – 2001. – Т. 41. – С.163-198.
4. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы Clostridium thermocellum, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов // Молекулярная биология – 2002. – Т. 36. – С. 868-876.
5. Horsch R.B., Fry J., Hoffmann N., Eicholtz D., Rogers S., Fraley R. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. – 1985. – Vol. 227. – P. 1229-1231.
6. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration // Plant Physiol. – 1977. – Vol. 60. – P. 313-116.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
8. Gamborg O.L., Miller L.A., Ojima K. Nutrient requiments of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151-158.
9. I. N. Berdichevets, H. R. Shimshilashvili, I. M. Gerasymenko, Y. R. Sindarovska, Y. V. Sheludko and I. V. Goldenkova-Pavlova Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 397. – P. 2289-2293.
10. Герасименко И. М., Сахно Л. А., Головач И. С., Кищенко Е. М., Синдаровская Я. Р., Шимшилашвили Х. Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, №1. – С. 127-133.
11. Wood T. M., Bhat K. M. Methods for measuring cellulase activities // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 87–112.
12. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 211. – P. 139–143.

KYRPA T.N.[1], RUDAS V.A.[1], OVCHARENKO O.A.[1], KLEBANOVICH A.A.[1], GERASYMENKO I.M.[1], IVANNIKOV R.V.[2], OSTAPCHUK A.N.[3], GOLDENKOVA-PAVLOVA I.V.[4], SHELUDKO Y.V.[1]

[1]Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str. 148, e-mail: ysheludko@ukr.net
[2]Grishko Central Botanical Garden NASU
Ukraine, 01014, Kiev, Timiryazevska str. 1
[3]Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str. 152
[4]Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS
Russia, 127276, Moscow, Botanicheskaya str. 35

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF Δ9-ACYL-LIPID DESATURASE OF CYANOBACTERIA IN ORCHID *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F.

Aims. Heterologous expression of desaturases in plants may cause change in fatty acid spectrum and improve their cold resistance. ***Methods.*** Transgenic plants were selected and analyzed after *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. ***Results.*** Protocols of *D. linguella in vitro* cultivation, genetic transforma-

tion and plant regeneration were developed. Transgenic plants of *D. linguella* carrying *desC::licBM3* hybrid gene were selected and analyzed. ***Conclusions***. *D. linguella* plants with high level of transgene expression showed change in fatty acid spectrum toward linolenic acid accumulation.
Key words: desaturase, transgenic plants, *Dendrobium linguella*.

КОМИСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСКАЯ С.И., АДАМЕНКО Н.И, ТИЩЕНКО Е.Н.
Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

АНАЛИЗ ЕФФЕКТИВНОСТИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) *IN PLANTA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *LBA*4404, НЕСУЩЕГО ПЛАЗМИДУ pBi2E С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Перспективной методологией для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам является генетическая инженерия, в рамках которой важен анализ целесообразности использования конкретных генов, связанных с этим процесом. В частности, представляет интерес ключевой ген катаболизма пролина – пролиндегидрогеназа (ProDH). Супрессия этого гена может приводить к увеличению содержания пролина и повышению уровня стресс-устойчивости растений [1-3].

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) – одна из основных и наиболее рентабельных масличных культур в мире и в Украине. Поэтому получение растений подсолнечника устойчивых к различным неблагоприятным условиям среды является важной экономической задачей. При разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника внимание исследователей главным образом сконцентрировано на *Agrobacterium*-опосредованной трансформации как направлении молекулярной биотехнологии, при котором наиболее часто наблюдается стабильная экспрессия трансгенов [4-6].

Результаты исследований генетической трансформации ряда видов однодольных и двудольных растений показали, что трудоёмкие и экономически затратные процедуры культивирования *in vitro* можно заменять применяя метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений *in planta* [7-12]. В связи с возможностью интеграции Т-ДНК в геном растений при опылении, представляет интерес метод Чумакова М.И. и соавт. [10], с использованием которого нами получены инбредные линии кукурузы, содержащие двухцепочечный РНК-супрессор (дцРНК-супрессор) гена пролиндегидрогеназы и их семенное поколение [12].

Частота генетической трансформации зависит от многих факторов, в том числе генотипа растений, штамма *Agrobacterium tumefaciens,* плазмидного вектора, условий инокуляции и культивирования. Цель данной работы состояла в анализе эффективности интеграции в геном подсолнечника дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta.*

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института), VK-121 (селекции Института масличных культур НААН Украины, Запорожская обл., п. Солнечный).

Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили штаммом *LBA*4404, содержащим бинарный вектор pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученым на основе гена арабидопсиса ProDH1, а также селективный ген неомицинфосфотрансферазы (*npt* II) *E. coli* (рис.1). Векторная конструкция любезно предоставлена к.б.н. Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск). Агробактерию наращивали в течение суток в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 26-28 ^{0}C, центрифугировали при 1700 g 10 мин [13]. Затем ресуспендировали в среде IM, которая содержала 12,5 мМ MES (2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту), 4 мМ NH_4Cl, 5,5 мМ $MgSO_4$, pH 5,7 [14, 15].

Agrobacterium-опосредованную трансформацию инбредных линий 96А/3, 16А/3, VK-121 *in planta* проводили в условиях вегетацион-