

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ $\Delta 9$ -ДЕСАТУРАЗЫ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ

© 2024 г. И. Г. Миловская^a, Н. В. Варламова^b, А. Ю. Стариков^a,
Д. В. Демиденко^b, О. С. Павленко^{a, b}, А. А. Тюрин^a, Д. С. Соболев^a,
Л. В. Куренина^b, И. В. Голденкова-Павлова^{a, *}, М. Р. Халилуев^{b, c}

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева”, Москва, Россия
*e-mail: irengold58@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2024 г.

После доработки 06.04.2024 г.

Принята к публикации 15.04.2024 г.

В данной работе мы исследовали возможность модификации жирнокислотного (ЖК) состава листьев томата (*Solanum lycopersicum* L.) за счет введения в его геном гена $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы цианобактерии (*Synechococcus vulcanus* C.). Для получения трансгенных растений томата, экспрессирующих десатуразу цианобактерии (*desC*), и оценки влияния данной десатуразы на ЖК-состав суммарных липидов были сконструированы вектора, несущие ген *desC*. Последовательность гена была слита с лидерными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта в хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) или цитоплазматической мембране. Полученными векторами трансформировали штамм *A. tumefaciens* *AGL0* для последующей агробактериальной трансформации растений томатов. ЖК анализ листьев показал, что для некоторых линий при локализации *desC* в цитоплазматической мембране или мембране ЭПР наблюдается увеличение содержания C16:1 и C16:2 жирных кислот. Для данных линий показано увеличение относительной представленности транскрипта *desC* по сравнению с трансгенными линиями, не показавшими изменения ЖК-состава. Полученные данные могут быть использованы для разработки стратегий направленной модификации жирнокислотного состава томатов.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, *Synechococcus vulcanus*, агробактериальная трансформация, $\Delta 9$ -десатураза, жирнокислотный состав.

DOI: 10.31857/S0015330324050089, EDN: MMENWN

ВВЕДЕНИЕ

Десатуразы жирных кислот (ЖК) — это ферменты, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных

цепях (C-C) в двойные связи (C=C). Десатуразы относятся к оксидазам со смешанной функцией, и для катализа им необходимы два электрона, донорами которых могут служить НАДФН или НАДН в зависимости от локализации десатуразы [1]. Все известные десатуразы в зависимости от формы, в которой находится ЖК, подвергающаяся окислению, делятся на три типа: ацилCoA- (используют ЖК, связанную с ацетил-CoA), ацил-АПБ- (используют ЖК, связанную с ацилпереносящим белком) и ацил-липидные десатуразы (используют ЖК в составе фосфолипидов). При этом первые два типа являются раствори-

Сокращения: АПБ — ацилпереносящий белок, ЖК — жирная кислота, ЖК-состав — жирнокислотный состав, Км — канамицин, НЖК — ненасыщенные жирные кислоты, ФК — фосфатидная кислота, ФХ — фосфатидилхолин, ЦПМ — цитоплазматическая мембрана, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, ACBP — acyl-CoA binding protein, EGFP — enhanced green fluorescent protein, FAD — fatty acid desaturase, RIM — root inducing medium.

мыми ферментами, а ацил-липидные десатуразы — мембраносвязанными. У растений функционируют ацил-АПБ (располагаются только в пластидах, растворимые) и ацил-липидные (тип I — в ЭПР, тип II — в пластидах, мембраносвязанные) десатуразы [1]. В отличие от растворимых ацил-АПБ десатураз, ацил-липидные десатуразы расположены в мембране и имеют консервативные гидрофобные области. Второй важной особенностью мембранных десатураз, отличающих их от растворимых форм, является наличие трех консервативных гистидиновых кластеров, участвующих в формировании активного центра.

У высших растений процессы десатурации жирных кислот проходят в двух клеточных компартментах: пластидах и ЭПР. Путь, протекающий в пластидах, называют “прокариотическим”, в ЭПР — “эукариотическим”. Синтез жирных кислот начинается в пластидах и приводит к образованию пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Далее образовавшиеся кислоты могут стать субстратом для десатураз, вводящих двойные связи и продуцирующие ненасыщенные жирные кислоты (НЖК). “Прокариотический” путь образования ненасыщенных ЖК осуществляется полностью в пластидах. C16:0 и C18:0 кислоты конъюгируют с глицерин-3-фосфатом, в результате чего образуется фосфатидная кислота (ФК). ФК является субстратом для действия ω -6 FAD6 и ω -3 FAD7 или FAD8 десатураз, которые синтезируют C18:2(Δ 9, 12) и C18:3(Δ 9, 12, 15) НЖК соответственно [2]. “Эукариотический” путь образования НЖК протекает со сменой компартментов, в которых находятся ЖК на различных этапах процессинга. Поскольку синтаза жирных кислот работает только в пластидах, а десатурация “эукариотического” типа происходит в ЭПР, стартовые вещества десатурации должны быть транспортированы из одного компартмента в другой. C16-кислота транспортируется в насыщенной форме, C18-кислота должна быть подвергнута десатурации по Δ 9-положению (с помощью фермента SSI2, являющегося растворимой ацил-АПБ-десатуразой и не задействованного в прокариотическом пути) и только потом может быть транспортирована из пластид. Предполагается, что ЖК могут самостоятельно диффундировать в межмембранное пространство, или могут быть транспортированы при участии переносчиков семейства FAX. Переносчиками из межмембранного пространства в цитоплазму предположительно могут являться длиноцепочечные ацил-СоА-синтазы, локализованные во внешней мембране пластид. Активированная ЖК, перенесенная в цитоплазму с помощью этих ферментов, транспортируется в ЭПР посредством ацил-СоА связывающего белка (ACBP — Acyl-CoA-binding protein). На мембране ЭПР остаток

ЖК из ацил-СоА, переносимый ACBP, участвует в синтезе фосфатидилхолина (ФХ) — основного транспортера ЖК в ЭПР. Помимо вышеописанного способа, C18:1 и C16:0 ЖК могут быть транспортированы из пластид в ЭПР напрямую, минуя цитоплазму, в местах контакта мембран двух органелл. Перенос при этом осуществляется через ФХ. Перенесенные в ЭПР ЖК подвергаются десатурации с помощью ω -6 FAD2 и ω -3 FAD3. Образованные ПНЖК могут транспортироваться посредством ФХ или ФК обратно в пластиды или к цитоплазматической мембране. При этом на мембране пластид в связывании и переносе ФК участвуют три белка: TGD1-3 (транспортер внешней мембраны хлоропласта), TGD4 (транспортер внутренней мембраны) и TGD5 (белок, расположенный в межмембранном пространстве и связывающий TGD1-3 и TGD5) [3]. Транспорт ЖК из ЭПР к плазматической мембране может осуществляться через прямой контакт мембран посредством везикул либо за счет белковых переносчиков. Так, ACBP1 и ACBP2 имеют домены связывания с ЭПР и плазмалеммой и выполняют функцию переносчиков. При этом, ACBP1 связывает C18-ацилСоА, ACBP2 специфичен в отношении C16-ацил-СоА. Таким образом, имеется согласованный обмен ЖК между тремя разными органеллами: пластидами, где начинается синтез, ЭПР и ЦПМ.

В отличие от высших растений, у которых обнаружены и растворимые и мембраносвязанные формы ферментов, для цианобактерий характерны только мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы. Двойные связи в Δ 9-, Δ 12-, Δ 15- и Δ 6-положения цепи ЖК вводят четыре белка — DesC, DesA, DesB и DesD соответственно. В первой реакции фермент, кодируемый *desC* геном, превращает стеариновую кислоту (C18:0) в олеиновую (C18:1). Образование линолевой кислоты (C18:2) катализируется десатуразой *desA*. DesB вводит третью двойную связь, образуя линоленовую кислоту [4].

Изменения в уровнях экспрессии десатураз, приводящие к изменениям ЖК-состава мембран, могут оказывать существенные влияния на восприимчивость растений к различным стрессам, например, холодовому воздействию, чувствительности к патогенам и другим [5, 6]. Tsypurskaya с коллегами [7] показали, что экспрессия генов Δ 9- и Δ 12-ациллипидных десатураз в растениях картофеля повышала их устойчивость к *Phytophthora infestans* по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями за счет накопления фенольных соединений в листьях. При введении двойной связи в цепи молекулы ЖК образуется изгиб. Данные изгибы приводят к менее плотной упаковке мембранных липидов, поскольку создается стерическое затруднение сближения молекул друг с другом.

Данный механизм важен для сохранения текучести мембран при пониженных температурах, и разработки на его основе используются в биотехнологии для получения холодоустойчивых сортов [8–11]. Таким образом, экспрессия собственных десатураз растения, а также введение гетерологичных генов десатураз является предметом активного изучения. Ряд работ в этом направлении сделан именно на растениях томатов.

Yu с соавт. [9] продемонстрировали, что избыточная экспрессия ЭПР-локализованной омега-3 десатуразы ЖК томатов (LeFAD3) приводила к повышенному содержанию линоленовой кислоты (18:3) и, как следствие, к толерантности трансгенных растений к холодовому стрессу. Похожие результаты при экспрессии LeFAD7 были получены Liu с соавт., которые показали толерантность трансгенных leFAD7-экспрессирующих томатов к низким температурам [12]. Другим похожим примером является работа Dominguez с коллегами, где авторы показали, что оверэкспрессия FAD3 и FAD7 десатураз в растениях томатов приводит к улучшению сопротивляемости к холодовому стрессу. Также авторы сделали интересное наблюдение, обнаружив, что трансгенные растения, экспрессирующие FAD7, в способности противостоять низким температурам превосходят растения, экспрессирующие FAD3. Причина этого состоит в локализации ферментов. FAD7 является десатуразой хлоропластов, тогда как FAD3 – ЭПР-локализованный фермент. Предполагается, что ненасыщенные ЖК в составе хлоропластной мембраны играют важную роль в защите белков фотосистемы II от воздействия низких температур. Поскольку FAD7 локализуется в хлоропластной мембране, его роль в защите от холодового стресса наиболее выражена. Стоит отметить, что при закаливании трансгенные FAD3-томаты демонстрировали устойчивость к холоду, сопоставимую с таковой для FAD7-растений, что может быть объяснено перемещением 18:3 ЖК от ЭПР к хлоропластам в процессе закаливания [13]. Таким образом, локализация фермента может играть важную роль в регуляции липидного метаболизма, и это необходимо учитывать, изучая десатуразы. Также в данной работе показано, что увеличенное соотношение 18:3/18:2 ЖК, контролируемое экспрессией перенесенной омега-3 десатуразой, приводило к улучшению качества плодов и усилению синтеза оксипинов, придающих томатам характерный аромат.

В нашем исследовании ген гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы (*desC*) цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, продукт которого локализован в ЭПР, ЦПМ или хлоропласте, использован для получения трансгенных растений томатов с последующей оценкой изменения ЖК состава в листовой ткани. Ранее в нашей лаборатории были получены обнадеживающие результаты

схожего эксперимента на растениях табака [14]. В данной работе мы, изменяя дизайн эксперимента, пробуем экстраполировать полученные ранее данные на растения томатов. Особенность нашего исследования – направленная локализация продукта гена *desC* в трех разных компартментах растительной клетки: цитоплазме, ЭПР и хлоропластах. Это достигалось за счет использования трех типов векторов, в которых целевой ген слит в рамке считывания с соответствующими сигнальными последовательностями. Для оценки эффективности функционирования гетерологичной десатуразы проведен анализ содержания различных ЖК в листьях трансгенных растений томата разных линий. Причина выбора данной сельскохозяйственной культуры в качестве объекта исследования состоит в растущем спросе на данный вид сельскохозяйственных растений в мире. Томаты содержат большое количество ликопина, каротиноидного пигмента, защищающего растения от окислительного стресса и избыточного освещения, а также известного своими терапевтическими свойствами. Благодаря свойствам ликопина производство культуры продолжает расти и изучение активности и регуляции работы десатураз, как потенциальных регуляторов ответа на стрессы представляется важной задачей.

$\Delta 9$ -десатураза (*desC*) из *S. vulcanus* представляет собой фермент из термофильной бактерии, температурный оптимум роста которой составляет 55°C. Эта десатураза, как и все десатуразы цианобактерий, является ацил-липидной, мембраносвязанной. Диапазон температур, в рамках которого фермент сохраняет свою функциональную активность, исследован в ряде работ. Было продемонстрировано, что белок успешно десатурирует свои субстраты при температурах 45, 37 и 35°C [15]. Orlova с соавт. показали, что экспрессия данной десатуразы в листьях табака при 22°C приводит к увеличению количества C18:1 жирной кислоты в составе листьев, благодаря чему трансгенные растения табака приобретали повышенную устойчивость к холоду [16]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что *desC*, экспрессируемый в двух видах табака (*N. benthamiana* и *N. excelsior*), проявляет свою активность в отношении C16:0 и C18:0 кислот [14] при 22°C. Таким образом, несмотря на то, что фермент *desC* представляет собой белок термофильной бактерии, обитающей при 55°C, в ряде работ доказана его функциональность при температуре 22°C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование экспрессионных векторов. При конструировании экспрессионных векторов использовались стандартные процедуры молекулярного клонирования и протоколы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Все

ферменты, используемые при конструировании векторов (эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигаза, Taq- и Pfu-ДНК-полимеразы, фосфатазы) использовались согласно протоколам фирм-изготовителей.

Первоначально последовательность гена *desC*, кодирующего ацил-липидную десатуразу $\Delta 9$ *Synechococcus vulcanus*, была получена методом ПЦР с использованием плазмиды pQE-*desC* в качестве матрицы и праймеров *descF1* и *descR1* (прямой и обратный праймеры, содержащие сайты рестрикции *ApaI* и *EcoRI* GGGCCCACATCATCCTTAGAA и GAATTCGGACAACGCTTTGGG, соответственно). Полученный ПЦР продукт клонировали в вектор pFGG, гидролизованный по сайтам *ApaI* и *EcoRI*, с получением вектора pFGG-*desC*. Плазмида pFGG-*desC*, несущая ген *desC*, обеспечивающий локализацию белкового продукта в цитоплазме использована и для сборки двух других векторов – pFGG-Lch-*DesC* и pFGG-LeB4-*DesC-ER*.

Растительный вектор экспрессии, несущий ген *desC*, слитый с последовательностью транзитного пептида малой субъединицы Lch Rubisco *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающей транспорт белкового продукта в хлоропласты, также получали в несколько этапов. Первоначально последовательность Lch, кодирующая этот транзитный пептид, была синтезирована методом ПЦР с использованием плазмиды pVIG-S2B [17] в качестве матрицы и праймеров *lchF3* и *lchR3* (прямой и обратный праймеры содержащие сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, GGTACCATGGCTTCTATGATATC и GGGCCCCTGATATTCAACTATAT, соответственно). Далее, полученный ПЦР продукт клонировали в вектор pFGG-*DesC*, гидролизованный по сайтам *KpnI* и *ApaI*, с получением вектора pFGG-Lch-*DesC*.

Растительный вектор экспрессии, несущий ген *desC*, слитый с последовательностями, обеспечивающими транспорт и удержание белка в эндоплазматическом ретикулуле, получали в несколько этапов. Первоначально последовательность LeB4, кодирующая транспортный пептид, была синтезирована методом ПЦР с использованием плазмиды pVIG-T2D [17] в качестве матрицы и праймеров *LebF4* и *LebR4* (прямой и обратный праймеры содержащие сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, GGTACCATGTCCAAACCTTTTCT и GGGCCCTGCTAAACATGTGCT, соответственно). Полученный продукт ПЦР клонировали в вектор pFGG-*DesC*, гидролизованный по сайтам *KpnI* и *ApaI*, с получением вектора pFGG-LeB4-*DesC*. Затем фрагмент *EcoRI*–*XbaI* плазмиды pVIG-T2D, несущий последовательность, кодирующую SRKDEL, сигнал удержания ЭР и сигнал полиаденилирования, клонировали в вектор pFGG-LeB4-*DesC*, гидролизованный

по сайтам *EcoRI* и *XbaI*, с получением вектора pFGG-LeB4-*DesC-ER*.

Растительные экспрессионные векторы pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC-ER*, используемые для дальнейшей трансформации растений томата были получены путем клонирования фрагментов *SpeI*–*XhoI* плазмид pFGG-*desC*, pFGG-Lch-*DesC* и pFGG-LeB4-*DesC-ER*, соответственно, в вектор pVIG-S, гидролизованный эндонуклеазами рестрикции *SpeI* и *XhoI*.

Правильное слияние гибридных генов с соответствующими лидерными последовательностями в экспрессионных векторах растений pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC-ER* было подтверждено секвенированием (“Евроген”, Россия).

Получение культур *Agrobacterium tumefaciens*, несущих целевые конструкции. Для трансформации растений томата использовали бактериальные культуры *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, несущие бинарные плазмидные векторы pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC-ER* (рис. 1).

Вектора переносили в штамм AGL0 *A. tumefaciens* путем электропорации [18].

Выращивание растений. Растения *Solanum lycopersicum* L. линии ЯЛФ выращивали при +24°C, 18 ч день/6 ч ночь и освещенности 100 мкмоль квантов/(м²/с) на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС-среда). Томаты ЯЛФ представляют собой чистую линию, используемую в качестве отцовской для получения гибрида F1 Юниор.

Трансформация растений. Эксперименты по получению трансгенных растений томата проводили методом со-культивирования семядольных эксплантов с разбавленной суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии наращивали в 20 мл неагаризованной среды Лурия-Бертани, дополненной соответствующими селективными антибиотиками, на качалке (180 об/мин) в течение 24 ч при 28°C в темноте. Затем культуру ресуспендировали в жидкой МС-среде добиваясь, чтобы оптическая плотность при длине волны 600 нм была равной 0.6–0.7. В серии экспериментов по агробактериальной трансформации были использованы семядольные листья, включая черешки, полученные от 10–12 суточных асептических проростков. За 3 сут. до инфицирования экспланты прекультивировали на агаризованной МС-среде, дополненной 5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0.1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), обеспечивающей наибольшую частоту непрямого органогенеза побегов. Затем у семядолей отсекали небольшую часть у основания и верхушки, после чего переносили в подготовленную бактериальную суспензию. Инокуляцию

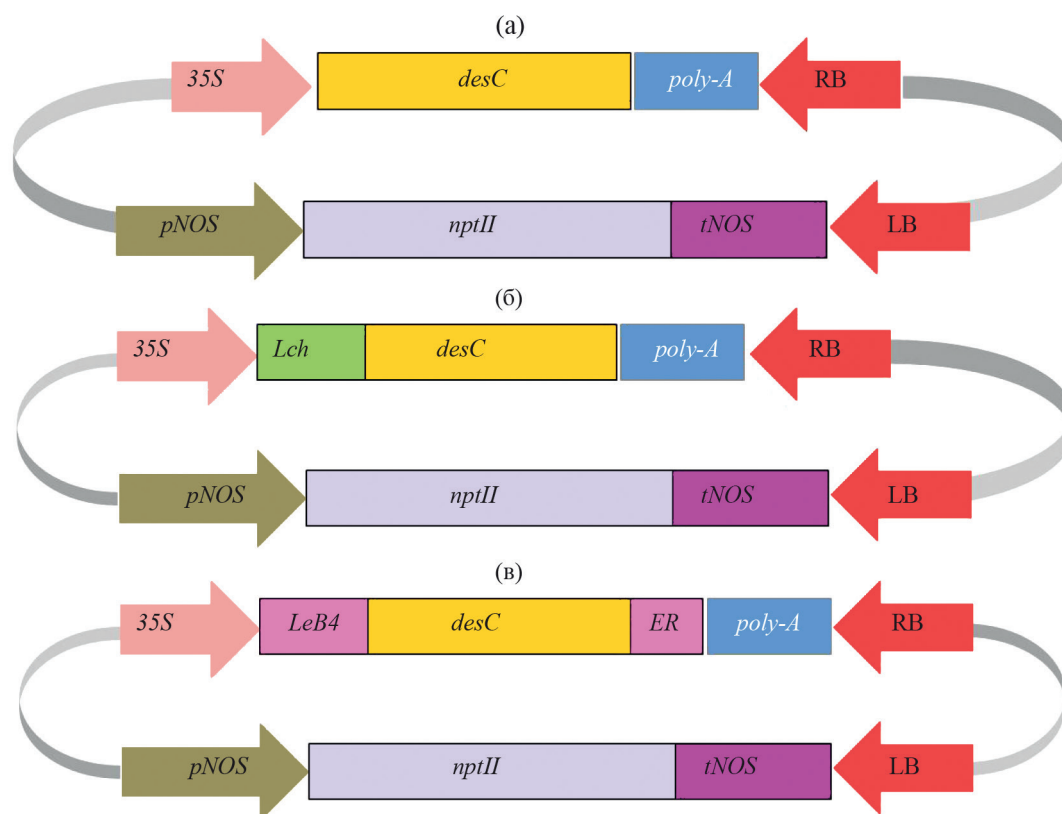


Рис. 1. Схематическое изображение участка Т-ДНК в плаزمиде pVIG-DesC (а), pVIG-Lch-DesC (б) и pVIG-LeB4-DesC-ER (в), используемых для агробактериальной трансформации томата. LB — левая граница; RB — правая граница; 35S — конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; pNOS — промотор нопалинсинтазы; nptII — ген неомицинфосфотрансферазы II; tNOS — последовательность терминатора нопалинсинтазы; desC — ген, кодирующий $\Delta 9$ -десатуразу *Synechococcus vulcanus*; Lch — лидерная последовательность гена, кодирующего малую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающая доставку кодируемого белка в хлоропласты; LeB4 — лидерная последовательность гена LeB4 гороха (*Vicia faba*), кодирующая промотор легумина B4, который обеспечивает компартментализацию белкового продукта в эндоплазматический ретикулум (ЭПР); последовательность ER, SKRDEL в 3'-области гена-мишени, кодирующая С-концевые аминокислоты для удержания целевого белка в ЭПР; поли-А, сигнальная последовательность полиаденилирования.

семядольных эксплантов осуществляли в течение 20 мин при периодическом перемешивании. Впоследствии экспланты переносили на диски из фильтровальной бумаги, помещенные на поверхность чашки Петри со МС-средой, и сокультивировали в темноте при температуре 16°C в течение 48 ч. После этапа сокультивирования семядольные экспланты 5 раз промывали в жидкой МС-среде с добавлением антибиотика тиментина (300 мг/л) для элиминации *Agrobacterium*. Затем экспланты семядолей культивировали на агаризованной МС-среде, дополненной 5 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л ИУК и 300 мг/л тиментина. Субкультивирование на свежую питательную среду осуществляли каждые 20 сут. Со второго пассажа в состав питательной среды включали селективный антибиотик канамицин (Км) в концентрации 10 мг/л, на третьем его концентрацию увеличивали до 25 мг/л и далее продолжали культивировать при таких условиях. С увеличе-

нием периода культивирования концентрацию антибиотика для элиминации агробактерии постепенно снижали с 300 мг/л до 150 мг/л. Регенерирующие Км-устойчивые побеги отделяли от каллусной ткани и переносили на питательную среду для индукции ризогенеза следующего состава: ½ МС-среда с добавлением 0.2 мг/л индолил-3-масляной кислоты и 100 мг/л Км.

Отбор и условия культивирования трансгенных растений. Молекулярный анализ первичных трансформантов проводили с помощью ПЦР. Первичные трансформанты растений, показавшие наличие целевых генов и отсутствие агробактериальной контаминации, адаптировали к почве, затем проводили самоопыление для получения поколения Т1. Отбор трансгенных растений поколения Т1 проводили в два этапа. На первом этапе проводили проращивание семян трансгенных растений поколения Т1 на селективной среде (агаризованная МС-среда, со-

держащая 100 мг/л Км). Перед проращиванием семена стерилизовали поочередной инкубацией в растворе 70% спирта (2 мин), 1% растворе гипохлорита натрия (5 мин) с последующей трехкратной отмывкой в воде (5, 10, 15 мин). На втором этапе проростки, полученные из семян, черенковали и вновь высаживали на селективную среду того же состава. Контрольные не трансформированные растения проращивали таким же образом, но в качестве среды использовали агаризованную МС-среду, не содержащую антибиотик. Банки с растениями помещали в климатическую камеру. Отобранные таким образом растения использовали для проведения ЖК-анализа и определения уровня экспрессии гетерологического гена методом ПЦР-РВ.

Экстракция ЖК и получение их метиловых эфиров. К навеске растительного материала (~50 мг) добавляли 5-кратный объем горячего (60°C) 96% этанола для фиксации. Для реакции омыления добавляли 5 М водный КОН до конечной концентрации 1 М с последующим растиранием тканей пестиком и инкубацией в течение 1 ч при 65°C с периодическим перемешиванием. Для количественного определения добавляли по 100 мкл стандарта – раствор гептадекановой кислоты в изопропанол (250 мкг/мл). Пробы от неомыленных компонентов промывали 500 мкл *n*-гексана. Свободные жирные кислоты получали, добавляя 50 мкл 20% H₂SO₄, и экстрагировали *n*-гексаном. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки и упаривали насухо на вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator plus (“Eppendorf”, Германия). Жирные кислоты метилировали, добавляя 200 мкл 1% H₂SO₄ в метаноле с последующей инкубацией 30 мин при 55°C. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали 250 мкл гексана.

ГХ-МС анализ. МЭЖК анализировали на приборе Хроматэк Кристалл 5000.2 NP (ЗАО СКБ “Хроматэк”, РФ) с квадрупольным МС детектором. Колонка Restek Rtx-2330 (60 м, кат. № 10726 “Restek”, США). Условия разделения МЭЖК: линейная скорость газа-носителя в колонке 1 мл/мин; объем вводимого образца 1 мкл; делитель потока 1:20, температура испарителя 260°C. Температурная программа градиентного анализа: плато 60°C 8 мин; нагрев до 170°C со скоростью 10°C/мин и 5 мин удержание этой температуры; нагрев от 170°C до 245°C со скоростью 6.5°C/мин и сохранение этой температуры до конца анализа. Рабочая температура МС-детектора – 230°C, энергия ионизации – 70 эВ. Идентификацию МЭЖК и расчет их количественного содержания в пробах проводили с использованием программы “Хроматэк Аналитик 3” и библиотеки спектров NIST.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Листья трансгенных растений томатов измель-

чали в жидком азоте. Выделение РНК для ряда образцов проводили с использованием набора GeneJET Plant RNAPurification Mini Kit (“Evrogen”, Россия), руководствуясь инструкцией производителя.

Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV ревертазы. Для получения первой цепи кДНК использовали протокол MMLV RT Kit (“Evrogen”, Россия). Кратко, готовили смесь, состоящую из РНК-матрицы (500 нг) и праймеров, которую прогревали 2 мин при 70°C, после чего добавляли заранее подготовленную смесь MMLV-ревертазы, буфера, dNTPs и DTT. Инкубировали 45 мин при 39°C. Для остановки реакции смесь прогревали 10 мин при 70°C. Полученные таким образом образцы кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ.

ПЦР-РВ. Метод ПЦР-реального времени (ПЦР-РВ) использовали для сравнительной относительной оценки уровня экспрессии целевого гена *desC* в трансгенных растениях томатов. Подбор праймеров производили с помощью программы NCBI PrimerBlast (табл. 1). В качестве референсных генов (эндогенных контролей) использовали гены актина и тубулина. Для относительного количественного анализа использовали ΔΔСТ-метод. Амплификация выполнялась на приборе QuantStudio 5 (“Applied Biosystems”, США). Для приготовления проб использовали готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (“Evrogen”, Россия). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 4 мкл qPCRmix-HS SYBR, 5 μМ каждого праймера и 100 нг матрицы кДНК. Использовали следующие условия амплификации: 95°C – 10 мин, далее 40 двухстадийных циклов 95°C – 15 с, 60°C – 30 с. Для возможности анализа специфичности образовавшихся продуктов проводили плавление образовавшихся дуплексов при условиях: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, 95°C – 1 с. Результаты, полученные в трех повторностях qPCR, были использованы для относительной количественной оценки уровня транскрипции. За единицу приняли количество целевой мРНК в растениях линии 94 с цитоплазматической

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных при проведении RT-qPCR.

Название праймера	5'-3' последовательность
qdecC-F	GCACTGGCTCTTTGGCAGTA
qdesC-R	CTGGGACTGCGGATAGACGA
qTubA_L-F	ACAACCTTTGCCCGTGGACAT
qTubA_L-R	TGCTCAAGAAGGGAGTGGGT
qAct_L_F	CCTCCTAACTGAAGCCCCTCT
qAct_L_R	CCTGCCAAGTCAAGACGGAG

локализацией трансгена. Отрицательный контроль для каждой пары праймеров содержал все компоненты, за исключением матрицы кДНК. Результаты амплификации обрабатывались с использованием программного обеспечения QuantStudio Design and Analysis Software v2.5.

Статистический анализ. Все эксперименты по анализу ЖК-состава листьев и анализу уровней экспрессии генов были проведены независимо не менее трех раз. Статистическую обработку результатов проводили в программе RStudio. Для определения достоверности различий использовали критерий Тьюки, предварительно убеждаясь, что анализируемые выборки имеют нормальное распределение. На графиках, построенных по полученным данным, представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование векторов

Для исследования вклада десатураз различных клеточных компартментов в формирование ЖК-профиля растительной клетки получены векторные конструкции трех типов: pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER (рис. 1). Растительный экспрессионный вектор pVIG-DesC несет последовательность гена $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы *S. vulcanus*. Вектор pVIG-Lch-DesC несет ген этой же десатуразы, слитый с последовательностью пептида малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (RuBisCo) *A. thaliana*, обеспечивающей хлоропластную локализацию целевого белка. Вектор pVIG-LeB4-DesC-ER также несет последовательность десатуразы *S. vulcanus*, в 5'-область которого клонирована последовательность, соответствующая сигнальному пептиду легумина гороха LeB4 для локализации белкового продукта в ЭПР, а в 3'-области добавлен фрагмент, кодирующий сигнал удержания белков в ЭПР. Эффективность обеспечения целевой локализации белкового продукта *desC* была продемонстрирована в нашей группе ранее [14]. Verestovoy с соавт.

оценивали локализацию гетерологичного белка *desC*, слитого с флуоресцентным белком EGFP, на модели протопластов с помощью флуоресцентной микроскопии. В результате была убедительно продемонстрирована целевая локализация белка в ЭПР, хлоропластах и цитоплазме.

Агробактериальная трансформация и получение регенерантов томата с устойчивостью к канамицину (Км)

Для получения трансгенных растений томата проводили серию независимых агробактериальных трансформаций с использованием различных штаммов AGL0, несущих плазмиды pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER. Всего в экспериментах было использовано 657 инокулированных семядольных эксплантов (табл. 2). В нашем исследовании применялась стратегия постепенной адаптации эксплантов к селективному антибиотику (без добавления Км на первом этапе культивирования, с добавлением Км до концентрации 10 и 25 мг/л на втором и третьем этапах, соответственно). Это было необходимо по причине того, что стрессовые условия, вызванные Км, могут приводить к значительному снижению каллусогенеза и регенерационного потенциала у семядольных эксплантов. Через 2–3 нед. после совместного культивирования семядольных эксплантов с суспензией *Agrobacterium* на срезе семядольного листа образовывался плотный светло-зеленый каллус. Экспланты, не образовавшие каллус, подвергались некрозу и становились коричневыми при культивировании на селективной среде. Частота некроза эксплантов варьировала от 29.4 до 77.2% в зависимости от плазмидных векторов. По прошествии 3 мес. культивирования были отобраны 20, 19 и 56 каллусных линий томата, устойчивых к Км, трансформированных плазмидами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER соответственно. Эффективность образования каллуса составила 9.5, 7.7 и 27.9% соответственно. Из плотных светло-зеленых каллусных тканей наблюдали массовую

Таблица 2. Характеристика трансгенных каллусов, полученных с помощью агробактериальной трансформации различными векторными конструкциями

Вектор	Количество семядольных эксплантов	Количество Км-устойчивых линий	Гены			Эффективность трансформации (%)
			npt II	VirB	desC	
pVIG-DesC	210	20	20	2	18	8.6
pVIG-Lch-DesC	246	19	19	6	8	3.3
pVIG-LeB4-DesC-ER	201	56	56	23	22	10.9

регенерацию побегов. Регенерированные побеги длиной 1.5 см отрезали от каллусной ткани и переносили на среду RIM (Root inducing medium), содержащую 100 мг/л Км. Канамицин-устойчивые побеги томата укореняли в течение 1–2 нед., клонально размножали *in vitro*, и затем были адаптированы к почвенным условиям.

ПЦР-анализ первичных трансформантов

Для ПЦР-анализа выделяли геномную ДНК из листьев проростков томата, укорененных на RIM, а также из листьев нетрансгенного контроля (линия ЯЛФ) (табл. 3). Для оценки пригодности выделенной ДНК для ПЦР-анализа амплифицировали последовательность гена *Tom52* (рис. 2а). Эффективность трансформации оценивали как процент независимых трансгенных линий томата, содержащих селективный (*nptII*) и целевой (*desC*) гены и не демонстрирующих признаки контаминации генами *Agrobacterium*, от общего количества трансформированных эксплантов. Также проводили определение наличия гена неомизин-фосфотрансферазы II (*nptII*). Фрагмент длиной 742 п.н. наблюдали у всех проанализированных предполагаемых трансформантов томата, тогда как в контроле соответствующей полосы не было обнаружено (рис. 2б). Чтобы исключить возможность контаминации генами *Agrobacterium* проводили ПЦР с использованием специфических праймеров, отжигающихся на последовательность гена *VirB*. Образцы ДНК, выделенные из 2, 6 и 23 линий томата, трансформированных плазмидными векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER, соответственно, содержали ген *VirB* (рис. 2в). Несколько трансгенных линий томата не содержали вставки целевого гена *desC* (рис. 2д). Таким образом, эффективность трансформации линии ЯЛФ с помощью векторных конструкций pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER варьировала от 3.3 до 10.9% соответственно.

Получение трансгенных растений томата T1

Все независимые трансгенные линии томата были успешно адаптированы к почве и самоопылены для получения семенного потомства T1 в тепличных условиях. Однако только 50% всех трансгенных линий томата T0 образовали жизнеспособные семена. Так, у 4, 6 и 14 первичных трансгенных линий томата, трансформированных плазмидными векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER, соответственно, развитие плодов после самоопыления не произошло или были получены бессемянные плоды без оплодотворения (табл. 4).

Анализ наследования гена *nptII* в семенном потомстве трансгенных растений томата поколения T1

Для определения наследования трансгена в семенном потомстве, самоопыленные семена, собранные от различных первичных трансгенных линий томата, были оценены на устойчивость к Км (табл. 5). Для усиления надежности отбор трансформантов проводили в два этапа. Первоначально семена проращивали на селективной среде, и далее проводили черенкование растений, которые вновь помещали на селективную среду. Применение этого подхода позволяет избежать отбора “негативных” трансформантов растений. 4 нед. культивирования на МС-среде с летальной концентрацией Км (150 мг/л) позволяли достоверно различить Км-чувствительные и Км-устойчивые растения. В данных условиях нетрансгенные проростки томата демонстрировали признаки хлороза, постепенно становились коричневыми и в последствии погибали, в то время как трансформированные проростки формировали хорошо развитые корни и росли здоровыми. χ^2 -тест для большинства трансгенных линий показал значение расщепления наследования селективного гена равное 3:1, что свидетельствует о стабильном менделевском наследовании гена *nptII* и вставке функционального трансгена в единственный локус генома томата. Однако в 7 трансгенных линиях томата наблюдалась и неменделевская схема наследования – коэффициент сегрегации между проростками устойчивыми и чувствительными проростками превышал критическое значение χ^2 , равное 3.84 ($df = 1$, $P < 0.05$).

Отбор трансгенных растений поколения T1

Методом агробактериальной трансформации с использованием трех типов векторных конструкций были получены первичные трансформанты растений томатов линий трех типов в зависимости от использованной лидерной последовательности. Были введены следующие обозначения: “ER” – для линий с ЭПР-локализацией, “Cyt” – для линий с цитоплазматической локализацией и “Chl” – для линий с хлоропластной локализацией белкового продукта гена десатуразы *desC*.

Фенотип большинства линий первичных трансформантов растений, выращенных на селективной среде, в основном, не отличался от растений контрольной линии, выращенных в условиях *in vitro*. У растений отмечена хорошо развитая мочковатая корневая система и развитый гипокотиль. Тем не менее, две линии трансгенных растений (50Chl и 8ER) характеризовались необычными фенотипами. У них

Таблица 3. Эффективность агробактериальной трансформации томатов сорта ЯЛФ векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER

Вектор	Количество семядольных эксплантов (шт.)								Количество Км-устойчивых каллусов	
	Всего		Подверглось некрозу		Контаминация генами агробактерии		Отобрано			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
pVIG-DesC	210	100	83	39.5	103	49.1	24	11.4	20	9.5
pVIG-Lch-DesC	246	100	190	77.2	29	11.8	27	11.0	19	7.7
pVIG-LeB4-DesC-ER	201	100	59	29.4	78	38.8	64	31.8	56	27.9

Таблица 4. Частота образования нормальных и бессемянных плодов в популяции трансгенных линий томата поколения T0

Вектор	Количество линий томатов поколения T0					
	Адаптировано к почве		Нормальных плодов		Бессемянных плодов	
			шт.	%	шт.	%
pVIG-DesC	18		14	77.8	4	22.2
pVIG-Lch-DesC	8		2	25.0	6	75.0
pVIG-LeB4-DesC-ER	22		8	36.4	14	63.6

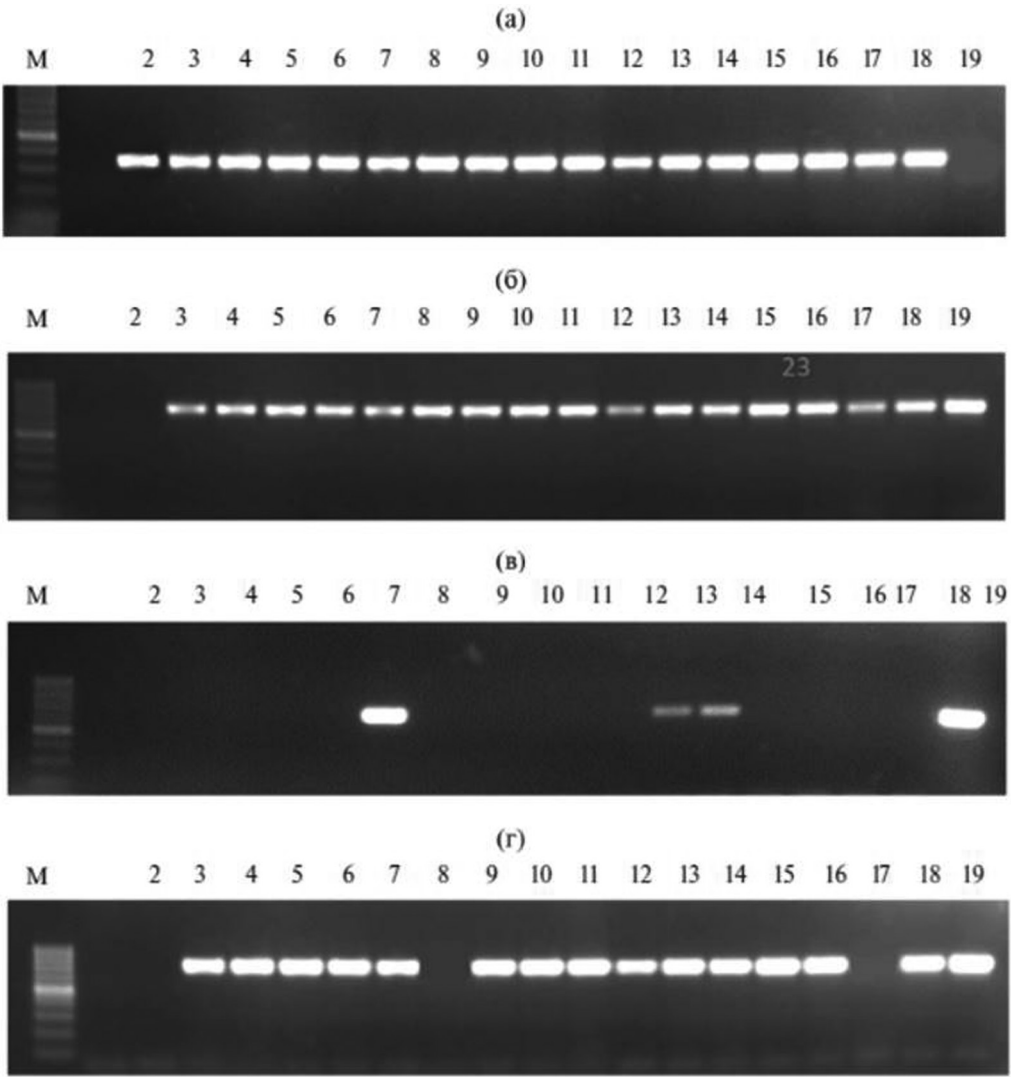


Рис. 2. ПЦР-амплификация генов Tom52 (а), nptII (б), VirB (в) и desC (г) на образцах геномной ДНК предполагаемых трансформантов и нетрансгенных растений томата. М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, “Fermentas”, Литва); 2 – отрицательный контроль (линия ЯЛФ); 3–18 – независимые трансформированные линии томатов; 19 – положительный контроль (плазмида pVIG-DesC).

выявлен сильно изогнутый гипокотиль с утолщением в нижней части (рис. 3).

В результате проведенного отбора для дальнейших исследований были выбраны 4 линии с ЭПР-локализацией, 5 линий с цитоплазматической локализацией и 1 линия с локализацией гетерологичного белка в хлоропластах. Использование для дальнейшей работы только одной линии растений с хлоропластной локализацией гетерологичной десатуразы обусловлено проблемами получения поколения T1 для данного типа трансформантов. А именно, отмечено, что большинство первичных трансформантов этой линии не образуют жизнеспособную пыльцу. Следует подчеркнуть, что сходные наблюдения были отмечены ранее в другом исследовании, в котором использование сигнальной последовательности RuBisCO для локализации белка холинэстеразы в хлоропластах также приводило к образованию стерильных растений. Это позволяет предположить, что локализация гетерологичных белков в хлоропластах может негативно сказываться на процессе формирования жизнеспособной пыльцы.

Результаты ПЦР-РВ

Для сравнительного анализа уровня транскрипции целевого гена *desC* в отобранных линиях использовали ПЦР-РВ метод. Было показано, что во всех линиях первичных трансформантов растений происходит транскрипция целевого гена, однако уровень транскрипции различается в широких пределах. Результаты представлены на рисунке 4. Было показано, что линии 25Cyt, 54ER, 8ER, характеризуются 3-, 4.5- и 5.5-кратным увеличением уровня мРНК целевого гена относительно линии сравнения, тогда как для линий 50ER, 10ER, 3Cyt, 12Cyt, 15Cyt, 50Chl этот показатель не превышает значения 2.17. В целом, различия в уровнях транскрипции *desC* могут быть обусловлены различием мест интеграции целевой последовательности в геном растения, поскольку при использовании метода агробактериальной трансформации интеграция Т-ДНК происходит случайным образом. Кроме того, различия в уровне транскрипции целевого гена можно также объяснить его различающейся дозой, поскольку анализ был проведен на T1-трансгенных растениях, содержащих как гомозиготные, так и гемизиготные формы.

Сравнительный анализ состава ЖК у контрольных и трансгенных растений

Для оценки функциональности гетерологичного фермента проведен сравнительный анализ содержания ЖК в листьях трансгенных растений. Данный подход ранее показал свою

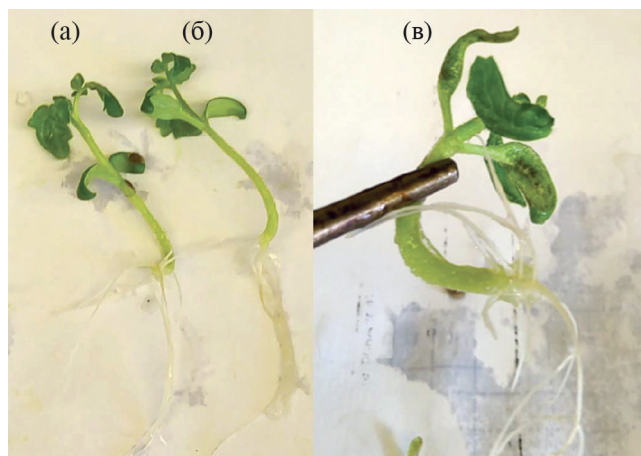


Рис. 3. Фенотип контрольных растений и первичных трансформантов растений. (а) — контрольное растение ЯЛФ (агаризованная МС-среда), (б) — трансгенное растение (линия 94Cyt) (агаризованная МС-среда + канамицин), (в) — трансгенное растение (линия 8ER) “необычного” фенотипа (агаризованная МС-среда + канамицин).

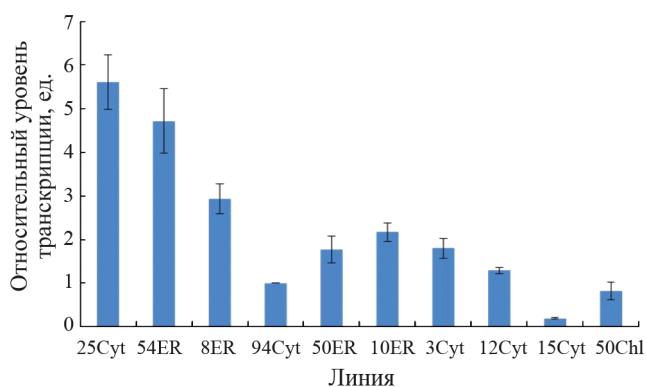


Рис. 4. Относительная представленность транскриптов гена *desC* в разных линиях трансформированных томатов. За единицу принята экспрессия линии 94Cyt.

состоятельность в ряде работ по изучению экспрессии гетерологичных десатураз в растениях. Так, Reza с соавт. использовали количественный показатель содержания линолевой и линоленовой кислот в качестве оценки функциональности дельта-12 десатуразы *desA* цианобактерии в листьях трансгенных растений картофеля [19]. Результаты данного исследования показали, что трансгенные растения характеризуются увеличенным содержанием ненасыщенных ЖК по сравнению с контрольными растениями. Важно, что для того, чтобы иметь возможность оценить уровень накопления гетерологичного фермента и отличить его активность от аналогичных активностей собственных десатураз картофеля, авторами было использовано слияние

Таблица 6. Содержание С16 ЖК (мг на г сухого веса) в листьях трансформированных растений томата

Линия	Тип ЖК		
	16:0	16:1	16:2
10ER	15.0 $\pm$ 5.16	0.3 $\pm$ 0.0598	0.1 $\pm$ 0.0354
50ER	14.2 $\pm$ 1.37	0.4 $\pm$ 0.117	0.05 $\pm$ 0.0480
54ER	13.5 $\pm$ 3.68	2.0 $\pm$ 0.625	0.4 $\pm$ 0.128
8ER	15.7 $\pm$ 1.53	1.2 $\pm$ 0.0197	0.3 $\pm$ 0.0797
50Chl	19.00 $\pm$ 1.60	0.2 $\pm$ 0.0966	0.04 $\pm$ 0.0412
3Cyt	29.7 $\pm$ 3.14	0.6 $\pm$ 0.123	0.1 $\pm$ 0.0271
94Cyt	16.3 $\pm$ 6.11	0.3 $\pm$ 0.0772	0.04 $\pm$ 0.0103
12Cyt	16.6 $\pm$ 1.36	0.4 $\pm$ 0.0208	0.04 $\pm$ 0.0407
15Cyt	18.8 $\pm$ 2.42	0.4 $\pm$ 0.0391	0.05 $\pm$ 0.00422
25Cyt	12.4 $\pm$ 1.82	2.4 $\pm$ 0.238	0.5 $\pm$ 0.136
Контроль	17.3 $\pm$ 2.73	0.3 $\pm$ 0.0237	0.04 $\pm$ 0.0407

Примечание: жирным шрифтом отмечены показатели, достоверно отличающиеся от контрольных ($P < 0.05$).

целевого белка с репортером — термостабильной лихеназой *C. thermocellum*. Таким образом, в этой работе параллельно с измерениями липидного состава, проводили анализ содержания целевого фермента посредством лихеназного метода, что позволяет с еще большей уверенностью говорить о достоверности связи между изменениями ЖК-состава и экспрессией бактериальной десатуразы в растениях.

Результаты ГХ-МС анализа содержания ЖК в листьях контрольных и трансгенных растений томатов представлены в таблицах 6 и 7.

По результатам ЖК-анализа, убедительно продемонстрировано достоверное увеличение пальмитоолеиновой кислоты (16:1) для трех линий, две из которых имеют ЭПР-локализацию фермента (54ER, 8ER), и одна — цитоплазма-

тическую локализацию (25Cyt). Для этих же линий показано достоверное увеличение 16:2 ($\Delta 9,12$) ЖК. Таким образом, для линий 25Cyt, 8ER, 54ER работа гетерологичного фермента desC в растениях томатов приводит к образованию 16:1 ЖК, которая является субстратом для $\Delta 12$ -десатуразы. Увеличение содержания субстрата (С16:1 ЖК) может приводить к накоплению продукта его десатурации под действием эндогенной $\Delta 12$ -десатуразы — С16:2 ($\Delta 9, 12$) ЖК. Схожие результаты получены в экспериментах, проведенных Verestovoy с соавт., где продемонстрированы сходные закономерности при транзгентной экспрессии desC гена в растениях табака. Следует отметить, что нами не выявлено изменение в уровне С18 ЖК, несмотря на то, что субстратом desC фермента преимущественно являются именно С18:0 ЖК. Помимо этого, показано, что индекс двойных связей у всех линий трансгенных растений, в том числе и у тех, которые демонстрировали изменения в ЖК-составе, остается неизменным относительно такового для контрольных растений.

В разных источниках сообщается о важной роли локализации десатураз в клетке. Так Dominguez с соавт. сообщают о доминантном вкладе хлоропласт-локализованной десатуразы в способность растений противостоять переохлаждению [13]. В работе Герасименко с соавт. была продемонстрирована активность гетерологичной desC десатуразы в растениях табака при локализации фермента в пластидах [20]. При этом экспрессия этого же гена, без направляющей в хлоропласт последовательности не приводила к изменению ЖК-состава. В нашей работе мы использовали три типа векторов для локализации белкового продукта в трех разных компартментах — хлоропластах, ЭПР и цитоплазме. Следует еще раз отметить, что первичные трансформанты растений, которые получали

Таблица 7. Содержание С18 ЖК (мг на г сухого веса) в листьях трансформированных растений томата

Линия	Тип ЖК			
	18:0	18:1	18:2	18:3
10ER	3.1 $\pm$ 1.30	0.2 $\pm$ 0.0561	7.3 $\pm$ 2.08	28.9 $\pm$ 10.3
50ER	2.4 $\pm$ 0.0919	0.2 $\pm$ 0.0707	8.3 $\pm$ 0.818	30.0 $\pm$ 2.71
54ER	2.7 $\pm$ 1.11	0.2 $\pm$ 0.0205	7.3 $\pm$ 1.06	29.2 $\pm$ 9.38
8ER	2.9 $\pm$ 0.494	0.4 $\pm$ 0.0256	8.8 $\pm$ 1.21	35.5 $\pm$ 6.32
50Chl	2.1 $\pm$ 0.626	0.2 $\pm$ 0.0254	5.6 $\pm$ 1.15	13.6 $\pm$ 2.47
3Cyt	5.3 $\pm$ 0.914	0.4 $\pm$ 0.0786	19.3 $\pm$ 4.04	57.7 $\pm$ 11.5
94Cyt	3.9 $\pm$ 1.23	0.1 $\pm$ 0.0973	9.3 $\pm$ 2.71	28.6 $\pm$ 7.87
12Cyt	2.3 $\pm$ 0.468	0.6 $\pm$ 0.133	11.5 $\pm$ 0.437	40.1 $\pm$ 5.22
15Cyt	3.5 $\pm$ 0.835	0.5 $\pm$ 0.0176	10.6 $\pm$ 1.06	40.5 $\pm$ 6.82
25Cyt	2.5 $\pm$ 0.674	0.3 $\pm$ 0.0581	7.6 $\pm$ 0.758	21.3 $\pm$ 3.62
Контроль	2.9 $\pm$ 0.727	0.4 $\pm$ 0.125	12.4 $\pm$ 2.09	31.8 $\pm$ 4.05

с использованием конструкции для хлоропластной локализации целевого белка, оказались не способны к образованию пыльцы и поколению T1 за исключением одной линии, которая и была проанализирована, однако изменений в ЖК-составе у этой линии не выявлено. Среди линий трансгенных растений с цитоплазматической и ЭПР-локализацией гетерологичной десатуразы обнаружены линии с измененным содержанием ненасыщенных ЖК. Эти результаты могут свидетельствовать о наличии субстратов для дельта-9-десатуразы как в составе цитоплазматической, так и ЭПР-мембран. Важно отметить, что наблюдаемые различия касаются C16:2 и C16:3 ЖК, тогда как содержание C18 ЖК во всех линиях трансгенных растений оставалось неизменным. Следует отметить, что об увеличении доли C16-ненасыщенных ЖК при экспрессии *desC* в растениях табака уже сообщалось ранее в работе Verestovoy с соавт. [14].

В нашем исследовании мы сопоставили данные ЖК-анализа листьев с данными, количественной оценки уровня мРНК целевого гена, для того, чтобы оценить взаимосвязь между уровнем представленности целевого транскрипта *desC* и содержанием ненасыщенных ЖК, как косвенным показателем активности белкового продукта *desC* [16]. Было показано, что линии трансгенных растений, которые характеризуются более высоким уровнем транскрипции гена *desC*, демонстрируют и увеличение содержания соответствующих ненасыщенных ЖК. Это линии – 25Cyt, 54ER, 8ER, у которых выявлен более высокий уровень относительного содержания транскрипта гена десатуразы по сравнению с линиями с неизменным ЖК-составом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом агробактериальной трансформации семядольных эксплантов с последующей регенерацией побегов путем непрямого органогенеза были получены независимые трансгенные растения томата линии ЯЛФ, экспрессирующие ген *desC*, с различной локализацией продукта экспрессии. Проведенный ГХ-МС анализ ЖК-состава позволил обнаружить линии (25Cyt, 8ER, 54ER), характеризующиеся увеличенным содержанием 16:1 и 16:2 ЖК в листьях. По данным ПЦР-РВ эти линии демонстрировали и увеличенный уровень транскрипции *desC* по сравнению с трансгенными линиями, ЖК-состав которых не отличался от контрольного значения. Таким образом, в данном исследовании нами сконструированы три линии трансгенных растений томатов с измененным ЖК-составом. Повышение содержания C16:1 ЖК, которая является субстратом для эндогенных дельта-12-десатураз, может при-

водить к увеличению экспрессии собственных ферментов растений с подобной активностью. Вероятно, именно изменение содержания C16:1 приводит к наблюдаемому увеличению количества C16:2 ЖК в полученных трансгенных линиях, в результате чего они могут являться хорошей моделью для изучения работы и регуляции эндогенных десатураз растений томата.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30003) и в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9, тема № 122032300112-7).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163.
2. He M., Qin C.-X., Wang X., Ding N.-Z. Plant unsaturated fatty acids: biosynthesis and regulation. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390>
3. Li N., Xu C., Li-Beisson Y., Philippart K. Fatty acid and lipid transport in plant cells // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 145. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.011>
4. Murata N., Wada H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria // J. Biochem. 1995. V. 308 P. 1. <https://doi.org/10.1042/bj3080001>
5. Kachroo P., Shanklin J., Shah J., Whittle E., Klessig D. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 9448. <https://doi.org/10.1073/pnas.151258398>
6. Song N., Hu Z., Li Y. Overexpression of a wheat stearyl-ACP desaturase (SACPD) gene TaSSI2 in *Arabidopsis* ssi2 mutant compromise its resistance to powdery mildew // Gene. 2013. V. 524. P. 222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.019>
7. Tsyurskaya E., Nikolaeva T., Lapshin P., Nechaeva T., Yuorieva N., Baranova E., Derevyagina M., Nazarenko L., Goldenkova-Pavlova I., Zagorskina N. Response of transgenic potato plants expressing heterologous genes of Δ9- or Δ12-Acyl-lipid desaturases to *Phytophthora infestans* infection // Plants. 2022. V. 11. P. 288. <https://doi.org/10.3390/plants11030288>
8. Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M. Low-temperature resistance of higher plants is significantly en-

- hanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase // Nat. Biotech. 1996. V. 14. P. 1003.
https://doi.org/10.1038/nbt0896-1003
9. Yu C., Wang H., Yang S., Tang X., Duan M., Meng Q. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 1102. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.008
 10. Zhou Z., Wang M., Hu J. Improve freezing tolerance in transgenic poplar by overexpressing a ω -3 fatty acid desaturase gene // Mol. Breeding. 2010. V. 25. P. 571. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9352-1
 11. Peng D., Zhou B., Jiang Y. Enhancing freezing tolerance of *Brassica napus* L. by overexpression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene (SAD) from *Sapium sebiferum* (L.) Roxb // Plant Sci. 2018. V. 272. P. 32. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.028
 12. Liu X., Teng Y., Li B. Enhancement of low-temperature tolerance in transgenic tomato plants overexpressing Lefad7 through regulation of trienoic fatty acids // Photosynth. 2013. V. 51. P. 238. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0014-5
 13. Dominguez T., Hernandez L., Pennycooke J., Jimenez P., Martinez-Rivas J., Sanz C., Stockinger E., Sanchez-Serrano J., Sanmartin M. Increasing ν -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 655. https://doi.org/10.1104/pp.110.154815
 14. Berestovoy M., Pavlenko O., Tyurin A., Gorshkova E., Goldenkova-Pavlova I. Altered fatty acid composition of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana excelsior* leaves under transient overexpression of the cyanobacterial desC gene // Biol. Plant. 2020. V. 64. P. 167. https://doi.org/10.32615/bp.2019.144
 15. Kiseleva L., Serebriiskaya T., Horváth I., Vigh L., Lyukevich A., Los D. Expression of the gene for the delta9 acyl-lipid desaturase in the thermophilic cyanobacterium. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 2. P. 331.
 16. Orlova I., Serebriiskaya T., Popov V., Merkulova N., Nosov A., Trunova T., Tsydendambaev V., Los D. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44. P. 447. https://doi.org/10.1093/pcp/pcg047
 17. Vyacheslavova A., Berdichevets I., Tyurin A., Shishilashvili K., Mustafaev O., Goldenkova-Pavlova I. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities // Russ. J. Gen. 2012. V. 48. P. 1067. https://doi.org/10.1134/S1022795412110130
 18. Höfgen R., Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 9877. https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9877
 19. Reza M., Goldenkova-Pavlova I., Pchelkin V., Tsydendambaev V., Los D., Nosov A. Acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologia. 2007. V. 53. P. 4.
 20. Герасименко И., Сахно Л., Кирпа Т., Остапчук А., Хаджиев Т. В., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены $\Delta 9$ - или $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 307.