

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ, НЕСУЩИХ ГЕНЫ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

И.М. Герасименко¹, Л.А. Сахно¹, И.С. Головач¹, Е.М. Кищенко¹,
Я.Р. Синдаровская¹, Х.Р. Шимшилашвили², Ю.В. Шелудько¹,
И.В. Голденкова-Павлова²

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

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: irengold@vigg.ru

Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах является одним из механизмов адаптации растений к понижению температуры. Гетерологическая экспрессия генов десатураз жирных кислот, которые определяют образование двойных связей в углеводородных цепочках, позволяет изменить состав жирных кислот мембран и повысить холодоустойчивость растений. С целью изучения механизмов холодовой адаптации и получения растений с новыми признаками была проведена генетическая трансформация как модельных объектов (теплолюбивого *Nicotiana tabacum* и холодостойкого *Arabidopsis thaliana*), так и ценных сельскохозяйственных видов (*Lactuca sativa*, *Brassica napus*) генами ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803. Слияние генов десатураз в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum* позволило отобрать линии табака и арабидопсиса, в которых происходит экспрессия целевых генов.

Ключевые слова: десатуразы жирных кислот, *Synechocystis*, *Synechococcus*, термостабильная лихеназа *Clostridium thermocellum*, генетическая трансформация, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*, *Brassica napus*, холодоустойчивость.

Введение

Исследование механизмов устойчивости растений к неблагоприятным абиотическим факторам и создание новых устойчивых форм ценных сельскохозяйственных видов приобретают особое значение в условиях глобальных климатических изменений и увеличивающегося загрязнения окружающей среды. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах является одним из механизмов адаптации растений к понижению температуры (Iba, 2002; Sakamoto, Murata, 2002). Введение дополнительных двойных связей в углеводородные цепочки липидного бислоя приводит к уменьшению температуры фазового перехода из жидкокристаллического в твердое состояние и обеспечивает необходимую текучесть мембран при пониженных температурах (Los, Murata, 2004; Guschina, Harwood,

2006). Образование двойных связей в остатках жирных кислот катализируют десатуразы жирных кислот (Лось, 2001). Эти ферменты распространены во всех группах живых организмов, они обнаружены у всех исследованных объектов за исключением некоторых видов бактерий, например *Escherichia coli* (Лось, 2001).

Хорошо изучены ацил-липидные десатуразы цианобактерий, которые используют в качестве субстрата жирные кислоты в составе липидов (Лось, 2001). В геноме *Synechocystis* sp. PCC 6803 присутствуют четыре гена, кодирующие эти ферменты. Каждая десатураза специфически вводит двойную связь в определенное положение по отношению к карбоксильному (Δ) или метильному концу (ω) углеводородной цепи жирной кислоты. Первую двойную связь в положении $\Delta 9$ вводит десатураза *DesC*, вторую – в положении $\Delta 12$ моноеновых жирных кислот – десатураза *DesA*. Известно, что основную роль

в адаптации к холоду цианобактерий играет десатураза *DesA* ($\Delta 12$), а нарушение генов *desD* и *desB* не влияет на устойчивость клеток к низким температурам (Лось, 2001). Доказательства ведущей роли моно- и диеновых жирных кислот в адаптации к холоду были получены и в опытах с растениями (Iba, 2002).

Гетерологическая экспрессия генов ацил-липидных десатураз цианобактерий в растениях позволяет изменить состав жирных кислот мембран и повысить холодоустойчивость. Примеры создания трансгенных растений, экспрессирующих гены ацил-липидных десатураз $\Delta 9$ и $\Delta 12$ цианобактерий, приведены в недавних публикациях (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996; Попов и др., 2005, 2006; Maali *et al.*, 2007, Демин и др., 2008).

С целью изучения механизмов холодовой адаптации и получения растений с новыми признаками нами была проведена генетическая трансформация как модельных объектов (теплолюбивого *Nicotiana tabacum* и холодоустойчивого *Arabidopsis thaliana*), так и ценных сельскохозяйственных видов (*Lactuca sativa*, *Brassica napus*) генами ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803. Для трансформации мы использовали как векторные конструкции с нативными генами десатураз, так и конструкции, в которых гены десатураз находились в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum* (Голденкова и др., 2002). Анализ полученных растений подтвердил эффективность использования лихеназы в качестве репортера в составе гибридных генов для детекции экспрессии целевого трансгена в полученных линиях растений.

Материалы и методы

Растительный материал

Для генетической трансформации были использованы асептические растения табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Wisconsin и рапса (*Brassica napus*) сортов Магнат и Обрий, которые выращивали *in vitro* на агаризованной питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962). Семена салата (*Lactuca sativa*) сорта Одесский

кучерявец проращивали в асептических условиях *in vitro* на агаризованной питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962). Растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia) выращивали в теплице.

Генетические конструкции

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*, были помещены под контроль промотора 35S PHK CaMV в генетические конструкции pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, содержащие ген *nptII* в качестве селективного. Получение и анализ вышеупомянутых генетических векторов описаны в недавних публикациях (Maali *et al.*, 2007; Маали и др., 2007). Ген *desC* под контролем промотора 35S PHK CaMV и терминатора нопалинсинтазы был помещен в генетическую конструкцию pCB141, содержащую селективный ген *bar* под контролем промотора нопалинсинтазы и терминатора октопинсинтазы (на основе вектора pICH5290 (Marillonnet *et al.*, 2005).

Генетическая трансформация

Для проведения генетической трансформации был использован штамм GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. Клетки наращивали в жидкой среде LB (Маниатис и др., 1984). Листовые экспланты растений табака, рапса и семидневных проростков салата культивировали совместно с суспензией агробактерий. Экспланты табака и салата помещали на среды для регенерации (табак – MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащая 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) (Horsch *et al.*, 1984)); салат – B5 (Gamborg *et al.*, 1968), содержащая 25 г/л сахарозы, 3 мг/л кинетина, 0,5 мг/л НУК). Экспланты рапса первоначально культивировали на среде для каллусогенеза (MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащая 2 мг/л 2,4-D, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л БАП), затем переносили на среду для регенерации (MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащая 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л НУК,

1 мг/л гибберелловой кислоты, 1 мг/л абсцизовой кислоты) (Сахно и др., 2008). Для отбора растений-трансформантов в питательные среды добавляли канамицин в концентрации 100 мг/мл (при трансформации с использованием генетических конструкций pBISN-desC, pBISN-desA, pBISN-desC-licBM3 и pBISN-desA-licBM3) или фосфинотрицин в концентрации 5 мг/л (при трансформации с использованием генетической конструкции pCB141). Генетическую трансформацию арабидопсиса проводили методом погружения соцветий в суспензию агробактерий. Собранные семена проращивали на питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащей канамицин в концентрации 50 мг/л. Устойчивые проростки пересаживали в грунт и выращивали в теплице.

Анализ растительной ДНК

Растительную ДНК выделяли, используя цетилтриметиламмоний бромид (The analysis ..., 2006). Концентрацию выделенной ДНК определяли, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 260 нм с помощью спектрофотометра BioPhotometer (Eppendorf, Германия).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержала 1 мкг растительной ДНК, 0,5 единиц активности ДНК-полимеразы *Taq* (Helicon, Россия) и соответствующий реакционный буфер, 0,5 мМ нуклеозидтрифосфатов и праймеры: licBM3-1 (gtcgtaaatacgcctttgttgca) и licBM3-2 (gttaggatagtattttacatattcg) для амплификации фрагмента гена *licBM3* длиной 642 п.о. в концентрации 0,5 мкМ каждый; desA-1 (gttgacaccaacggtaacgcc) и desA-2 (ccagttaaaggctgcgctgtaa) для амплификации фрагмента гена *desA* длиной 949 п.о. в концентрации 0,25 мкМ каждый; desC-1 (cctcaattggggcctttgtcttc) и desC-2 (aactgtaccttgccggaaga) для амплификации фрагмента гена *desC* длиной 777 п.о. в концентрации 0,25 мкМ каждый; virD1-1 (atgtcgaaggcagtaagccca) и virD1-2 (ggagtcttcagcatggagcaa) для амплификации фрагмента гена *virD1* длиной 432 п.о. в концентрации 0,25 мкМ каждый; act-1 (tttgctggagatgatgc) и act-2 (cttgaatggcgacatac) для амплификации фрагмента гена актина табака длиной 351 п.о. в концентрации 0,5 мкМ каж-

дый. Амплификацию проводили в следующих условиях: 5 мин 94 °С; 30 циклов (30 сек 94 °С; 45 сек 60 °С; 45 сек 72 °С); 5 мин 72 °С.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1 %-м агарозном геле, используя 1x буфер TAE (Маниатис и др., 1984), и визуализировали с помощью бромистого этидия. В качестве маркера размера ДНК использовали O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus или O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Экстракция суммарных растворимых белков и определение активности термостабильной лихеназы

Свежую или замороженную жидким азотом ткань растирали в ступке с 50 мМ Tris-HCl (pH = 8,0) буфером (для экстракции 1 г ткани использовали 2–4 мл буфера). Экстракт центрифугировали при 10000 × g в течение 10 мин и отбирали надосадочную жидкость.

Качественное определение активности термостабильной лихеназы проводили методом чашечного теста. В чашки Петри заливали 2 %-ю агарозу, содержащую 50 мМ Tris/HCl (pH 8,0) и 0,05 % лихенана (Megazyme, Ирландия). В подготовленные лунки помещали по 20 мкл растительных экстрактов. Чашки инкубировали при температуре 65 °С в течение 1 часа, окрашивали в 0,5 %-м растворе Конго красного (Sigma, США) в течение 15 минут и отмывали в 1 М растворе NaCl до появления светлых пятен в области гидролиза лихенана.

Результаты

Генетическая трансформация растений табака

Генетическая трансформация растений табака была проведена с помощью векторных конструкций pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, которые несут 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 CaMV. После регенерации устойчивых

растений на питательной среде, содержащей канамицин, присутствие в них перенесенных генов было доказано методом ПЦР (рис. 1, а). Для того чтобы исключить ложноположительные сигналы, обусловленные агробактериальным загрязнением, была проведена ПЦР с праймерами для амплификации фрагмента гена *virD1* штамма GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. В результате было отобрано 5 растений, несущих нативный ген *desC*– $\Delta 9$ -десатураза; 5 растений с нативным геном *desA*– $\Delta 12$ -десатураза; 19 растений с гибридным геном *desC-licBM3*– $\Delta 9$ -десатураза, слитая с лихеназой, и 5 растений, содержащих гибридный ген *desA-licBM3*– $\Delta 12$ -десатураза, слитая с лихеназой. Семена, полученные путем самоопыления растений, несущих гибридный ген *desC-licBM3*, были пророщены, и присутствие в полученных растениях целевых генов было доказано методом ПЦР (рис. 1, б).

В растениях, трансформированных гибридными генами десатураз, слитыми с термостабильной лихеназой, была проверена активность репортерного белка. В 11 из 19 растений с геном *desC-licBM3* и в 3 из 5 растений с геном *desA-licBM3* термостабильная лихеназа была активна (рис. 2). Повторная проверка активности репортерного белка, проведенная через 6 месяцев, показала, что в одной из трех линий, несущих

гибридный ген *desA-licBM3*, экспрессия трансгена отсутствовала.

Растения табака двух линий, экспрессирующие гибридный ген *desA-licBM3*, были использованы для повторной генетической трансформации с помощью векторной конструкции pCB141, несущей нативный ген *desC* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Устойчивые растения, регенерировавшие на среде с фосфинотрицином, были проверены методом ПЦР. Наличие двух целевых генов было показано для всех 20 отобранных растений (рис. 1, в). Шесть из них были использованы для проверки активности в составе гибридного белка термостабильной лихеназы, которая была показана во всех случаях.

Генетическая трансформация растений арабидопсиса

После генетической трансформации арабидопсиса с помощью векторных конструкций pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3* было отобрано 4 растения, несущих гибридный ген *desC-licBM3*– $\Delta 9$ -десатураза, слитая с лихеназой, и 16 растений, несущих гибридный ген *desA-licBM3*– $\Delta 12$ -десатураза, слитая с лихеназой (рис. 3, а, б). Активность термостабильной лихеназы в соста-

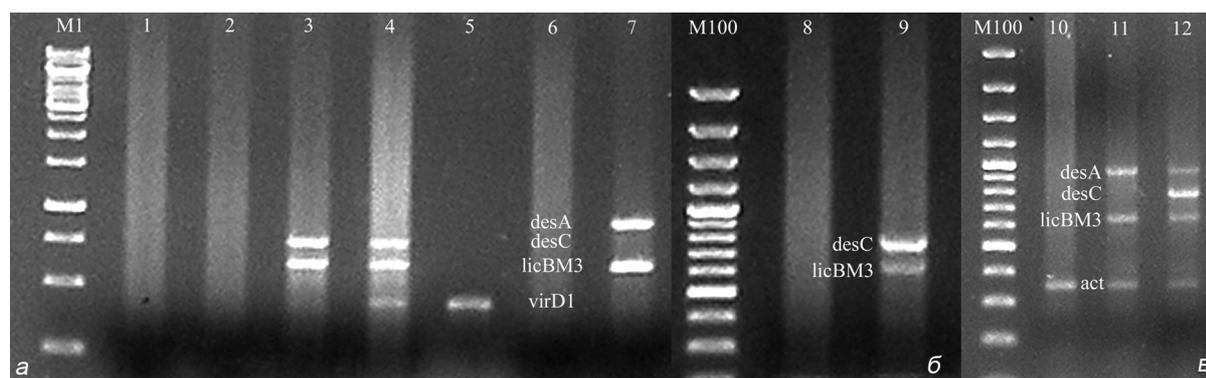


Рис. 1. Детекция гибридных генов десатураз в растениях табака методом ПЦР.

а – с использованием 4 пар праймеров для амплификации фрагментов генов *licBM3*, *desC*, *desA* и *virD1*; б) с использованием 2 пар праймеров для амплификации фрагментов генов *licBM3* и *desC*; в – с использованием 4 пар праймеров для амплификации фрагментов перенесенных генов *licBM3*, *desC*, *desA* и гена актина табака. М1 – маркер размера ДНК (1 kb); М100 – маркер размера ДНК (100 bp); 1, 6, 8, 10 – ДНК нетрансформированных растений; 2–4 – ДНК растений, трансформированных геном *desC-licBM3* (2 – нетрансгенное растение; 3 – растение, несущее целевой ген; 4 – растительный материал, содержащий агробактерии); 5 – ДНК *Agrobacterium tumefaciens*; 7 – ДНК растения, трансформированного геном *desA-licBM3*; 9 – ДНК растения, полученного в результате самоопыления первичного трансформанта, несущего ген *desC-licBM3*; 11 – ДНК растения, трансформированного геном *desA-licBM3*; 12 – ДНК растения трансформированного генами *desA-licBM3* и *desC*.

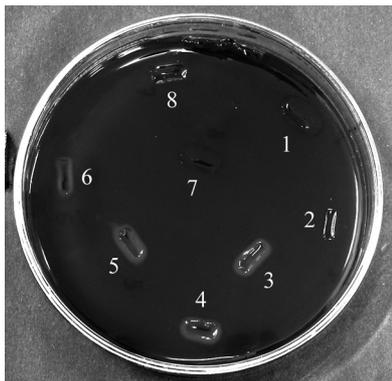


Рис. 2. Определение активности термостабильной лихеназы в растениях табака и салата.

1 – нетрансформированное растение табака; 2 – растение табака, несущее неактивный ген *desC-licBM3*; 3 – растение табака, несущее активный ген *desC-licBM3*; 4–6 – растения табака, несущие активный ген *desC-licBM3*; 7 – нетрансформированное растение салата; 8 – растение салата, несущее неактивный ген *desA-licBM3*.

ве гибридного белка была продемонстрирована для всех проверенных растений (4 с геном *desC-licBM3* и 10 с геном *desA-licBM3*).

Генетическая трансформация растений салата

Генетическая трансформация растений салата была проведена с помощью векторных конструкций *pBISN-desC-licBM3* и *pBISN-desA-licBM3*, которые несут гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC* и *desA*, слитые с геном термостабильной лихеназы. После регенерации устойчивых растений на питательной среде, содержащей канамицин, присутствие в них перенесенных генов и отсутствие агробактериального загрязнения было доказано

методом ПЦР (рис. 3, в). Ни в одном из полученных 5 растений не удалось выявить активность репортерного белка (рис. 2).

Генетическая трансформация растений рапса

Генетическая трансформация растений рапса была проведена с помощью векторных конструкций *pBISN-desC-licBM3* и *pBISN-desA-licBM3*. После регенерации устойчивых растений на питательной среде, содержащей канамицин, присутствие в них перенесенных генов и отсутствие агробактериального загрязнения были доказаны методом ПЦР. В результате было отобрано 1 растение сорта Обрий, несущее ген *desC-licBM3*, и 9 растений сорта Магнат с геном *desA-licBM3* (рис. 3, г, д). Тест на активность лихеназы был проведен с 4 растениями. Ни в одном из них не удалось обнаружить активность репортерного белка.

Обсуждение

Одной из основных проблем генетической инженерии растений является невысокий уровень экспрессии (Streatfield, 2007) или замолчание перенесенных генов (Дорохов, 2007). Использование трансляционного слияния целевого и репортерного белков значительно облегчает процедуру отбора наиболее продуктивных трансформантов, а также позволяет контролировать экспрессию трансгенов в ходе дальнейших экспериментов. Это особенно важно, если непосредственное тестирование активности целевых белков затруднено присутствием аналогичных ферментативных активностей

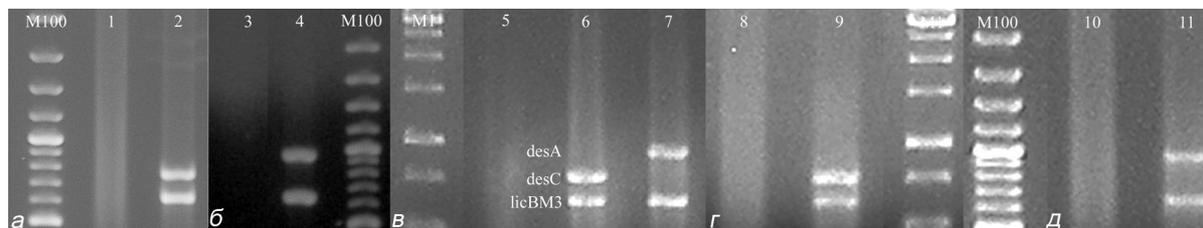


Рис. 3. Детекция гибридных генов десатураз методом ПЦР в растениях.

а, б – арабидопсиса; в – салата; г, д – рапса. М1 – маркер размера ДНК (1 kb); М100 – маркер размера ДНК (100 bp); 1, 3, 5, 8, 10 – ДНК нетрансформированных растений; 2, 6, 9 – ДНК растений, трансформированных геном *desC-licBM3*; 4, 7, 11 – ДНК растений, трансформированных геном *desA-licBM3*.

растения-хозяина, как в случае с десатуразами жирных кислот, которые встречаются практически во всех живых организмах (Лось, 2001). Используемая нами в качестве репортера лихеназа *Clostridium thermocellum* обеспечивает высокую специфичность анализа благодаря своей термостабильности (Голденкова и др., 2002), а также, как было показано ранее, не препятствует проявлению ферментативной активности ацил-липидных десатураз *Synechocystis* (Маали и др., 2007; Maali *et al.*, 2007). В результате нами были отобраны растения модельных видов *Nicotiana tabacum* и *Arabidopsis thaliana*, которые экспрессируют гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *S. vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis*. Впервые были получены растения табака, несущие два гена ацил-липидных десатураз цианобактерий.

Была успешно проведена генетическая трансформация гибридными генами десатураз сельскохозяйственно ценных видов *Lactuca sativa* и *Brassica napus*. Для выяснения причины отсутствия активности репортерного белка в полученных растениях требуются дополнительные исследования. Наиболее вероятными объяснениями представляются посттранскрипционное замолкание перенесенных генов (Дорохов, 2007) и/или низкий уровень трансляции транскрипта, обусловленный наличием редких для растения-хозяина кодонов (Streatfield, 2007).

Новизна и актуальность выполненной работы заключаются в создании модельной базы для исследования физиологических, генетических и молекулярно-биологических характеристик высших растений, которые экспрессируют гены ацил-липидных десатураз цианобактерий с различной субстратной специфичностью, являющиеся функционально гомологичными растительным генам. Полученные растения табака и арабидопсиса являются удобными моделями для изучения механизмов адаптации растений к абиотическим стрессам. Важным аспектом работы является доказательство эффективности использования конструкций с гибридным геном, включающим в качестве репортера термостабильную лихеназу, для детекции трансгенных растений с высоким уровнем экспрессии функционального целевого трансгена. На сегодняшний момент существуют только отдельные публикации, показывающие перспективность

применения такого подхода для изучения физиологических характеристик трансгенных растений и/или селекции высокопродуктивных линий (см., например, Голденкова-Павлова и др., 2007; Abdeev *et al.*, 2009). В ближайшее время будут проведены дальнейшие исследования для оценки физиологических характеристик полученных трансгенных растений в условиях холодного стресса.

Благодарности

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

- Голденкова-Павлова И.В., Мирахорли Н., Маали А.Р. и др. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам // Цитология и генетика. 2007. Т. 41. № 3. С. 44–49.
- 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. Вып. 4. С. 868–876.
- Демин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией // Физиология растений. 2008. Т. 55. Вып. 5. С. 710–720.
- Дорохов Ю.Л. Умолкание генов у растений // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. Вып. 4. С. 579–592.
- Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 163–198.
- Маали Р., Шимшилашвили Х.Р., Пчелкин В.П. и др. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной Δ^9 -десатуразы в бактерии *Escherichia coli* // Генетика. 2007. Т. 43. Вып. 2. С. 1–7.
- Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 521 с.
- Попов В.Н., Кипайкина Н.В., Астахова Н.В., Труно-

- ва Т.И. Особенности окислительного стресса растений табака, трансформированных геном *desC* $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы из *Synechococcus vulcanus*, при гипотермии // Физиол. растений. 2006. Т. 53. Вып. 4. С. 525–529.
- Попов В.Н., Орлова И.В., Кипайкина Н.В. и др. Влияние трансформации табака геном $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы из *Synechococcus vulcanus* на устойчивость растений к низкой температуре // Физиол. растений. 2005. Т. 52. Вып. 5. С. 747–750.
- Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях // Цитология и генетика. 2008. Т. 42. Вып. 1. С. 16–22.
- Abdeev R.M., Abdeeva I.A., Bruskin S.S. *et al.* Bacterial thermostable beta-glucanases as a tool for plant functional genomics // Gene. 2009. V. 436. P. 81–89.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exptl. Cell Res. 1968. V. 50. P. 151–158.
- Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters. 2006. V. 580. P. 5477–5483.
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. *et al.* Inheritance of functional foreign genes in plants // Science. 1984. V. 223. P. 496–498.
- Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 225–245.
- Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M. *et al.* Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase // Nature Biotechnol. 1996. V. 14. P. 1003–1006.
- Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 142–157.
- Maali A.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P. *et al.* Acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologija. 2007. V. 53. P. 4–7.
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R. *et al.* Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. P. 718–723.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Sakamoto T., Murata N. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. P. 206–210.
- Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants // Plant Biotechnol. J. 2007. V. 5. P. 2–15.
- The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms / Eds M. Querci, M. Jermini, G. Van der Eede. Luxembourg: Office for Official Publ. of the European Communities, 2006. 229 p.

RAISE OF PLANTS POSSESSING GENES FOR ACYL-LIPID DESATURASES FROM THE CYANOBACTERIA

I.M. Gerasymenko¹, L.O. Sakhno¹, I.S. Golovach¹, O.M. Kishchenko¹, Y.R. Sindarovska¹,
C.R. Shimshilashvili², Y.V. Sheludko¹, I.V. Goldenkova-Pavlova²

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS, Kiev, Ukraine, e-mail: ysheludko@ukr.net;

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia, e-mail: irengold@vigg.ru

Summary

The elevated level of membrane fatty acid desaturation is one of the chilling adaptation mechanisms in plants. Fatty acid desaturases are enzymes that introduce double bonds into fatty acyl chains. Heterologous expression of desaturase genes alters membrane fatty acid composition and enhances chilling tolerance of plants. In order to study chilling tolerance mechanisms and to obtain plants with novel features, we have carried out genetic transformation of model objects (chilling-sensitive *Nicotiana tabacum* and chilling-resistant *Arabidopsis thaliana*) and agricultural species (*Latuca sativa* and *Brassica napus*) with acyl-lipid desaturase genes *desC* ($\Delta 9$) и *desA* ($\Delta 12$) of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Translational fusion of the desaturase genes with a reporter gene coding for thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* allowed selection of tobacco and *Arabidopsis* plants that expressed the target genes.

Key words: fatty acid desaturases, *Synechocystis*, thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum*, genetic transformation, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Latuca sativa*, *Brassica napus*, chilling tolerance.