

УДК 575.827:604.6:582.683.2

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНА *desC* ЦИАНОБАКТЕРИИ В РАСТЕНИЯХ РАПСА НЕ ИЗМЕНЯЕТ ИХ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ

М. С. СЛИВЕЦ^{1,2}, Л. А. САХНО¹, Ю. В. ШЕЛУДЬКО¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
 Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148

² Национальный технический университет Украины «Киевский Политехнический
 Институт»
 Украина, 03056, г. Киев, проспект Победы, 37
 e-mail: sakhno@icbge.org.ua

Цель. Тестирование созданных ранее растений рапса, экспрессирующих ген $\Delta 9$ (*desC*) ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, слитый в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы (*licVM3*) *Clostridium thermocellum*, в асептических условиях при низких положительных температурах. **Методы.** Измерение сырой биомассы (СБ), содержания суммарного растворимого белка (СРБ) и активности супероксиддисмутазы (СОД) в тканях листьев. **Результаты.** Растения рапса (предварительно размноженные черенкованием в культуре *in vitro* контрольные (нетрансформированные) и несущие трансген *desC*) достоверно не отличались между собой по СБ, содержанию СРБ и активности СОД при выращивании при температуре +22 °С, при переносе их для роста на +4 °С, а также при возврате к исходным температурным условиям (+22 °С). **Выводы.** Растения рапса, в которых происходит экспрессия *DesC* цианобактерии без компартментализации в хлоропластах, не изменяют свою толерантность к низким положительным температурам по сравнению с нетрансформированными растениями.

Ключевые слова: *Brassica napus* рапс, десатуразы, *desC*, низкие положительные температуры, СОД, цианобактерия.

Введение. Одним из механизмов адаптации растений к стрессам (холоду, фитопатогенным микроорганизмам) является увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах, обеспечивающее им необходимую текучесть [1]. Так, например, показано, что по мере снижения среднесуточной температуры происходило закономерное уменьшение содержания насыщенных и увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот в листьях четырех исследованных видов лекарственных растений, произрастающих в условиях Предбайкалья – вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L., манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L., тысячелистника *Achillea* sp. и одуванчика *Taraxacum* sp. [2]. В тканях корней пшеницы *Triticum aestivum* L. и пырейника сибирского *Elymus sibiricus* L. биосинтез α -линоленовой кислоты контролировался микросомальной $\omega 3$ десатуразой. При понижении температуры содержание α -линоленовой кислоты увеличивалось с 6,1 до 17,1 % в пшенице и с 7,1 до 12,0 % в пырейнике сибирском [3]. Катализируют превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях

© М. С. СЛИВЕЦ, Л. А. САХНО, Ю. В. ШЕЛУДЬКО, 2013

(C–C) в двойную связь (C=C) десатуразы жирных кислот [1].

К настоящему времени получен ряд как модельных (табак *Nicotiana tabacum* L., резушка Таля *Arabidopsis thaliana* L.), так и сельскохозяйственно ценных (картофель *Solanum tuberosum* L., рапс *Brassica napus* L.) растений с измененным количеством моно- и полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов благодаря гетерологической экспрессии ацил-липидных десатураз. Существенное повышение холодоустойчивости наблюдали у растений табака, экспрессировавших $\Delta 9$ -ацил-липидную десатуразу (*desC*) цианобактерии *Anacystis nidulans*, которая катализирует образование цис-двойной связи в позиции $\Delta 9$ как в 16-, так и в 18-углеродных насыщенных жирных кислотах [4]. Изменения восприимчивости к низким температурам наблюдали также у растений табака, экспрессировавших либо кДНК десатуразы $\Delta 9$ -устойчивого к холоду картофеля *Solanum commersonii* [5], либо *DesC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* [6], либо *FAD7* арабидопсиса [7]. Введение десатураз различного происхождения позволяло трансформантам выдерживать значительные холодовые нагрузки и приводило к сравнимым результатам в повышении холодоустойчивости. Растения картофеля становились более устойчивыми к пониженным температурам после введения как гена $\Delta 9$ -десатуразы дикого картофеля *Solanum commersonii* [8], так и гена десатуразы $\Delta 12$ (*DesA*) *Synechocystis* sp. PCC 6803 [9]. Экспрессия *desA* *Synechocystis* давала растениям возможность сильнее противостоять поражению патогенным грибом *Phytophthora infestans* [10].

Ранее с использованием разработанной нами методики [11] были получены растения рапса с трансгеном *desC* *Synechococcus vulcanus* [12]. Ген десату-

разы цианобактерии был слит в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы (*licBM3*) *Clostridium thermocellum*. Наличие последовательности гена *licBM3* в составе гибридного продукта позволило качественно (с помощью чашечного теста) и количественно (фотометрически) оценить экспрессию слитого с ним гена десатуразы. Кроме того, экспрессия трансгена *desC* подтверждена с использованием газовой хроматографии, которая показала изменения количественного состава жирных кислот в липидах листьев: уменьшение содержания насыщенных (C16:0, на 16%) и увеличение количества триеновых (C16:3, на 33 %) жирных кислот [13]. Кроме того, отмечено увеличение общего содержания липидов (до 48%) в листьях некоторых трансгенных растений (18b и 18a/6). Целью данных экспериментов было тестирование созданных *desC* растений рапса, экспрессирующих гетерологическую $\Delta 9$ ацил-липидную десатуразу, в условиях низких положительных температур.

Материалы и методы

Растительный материал. Для экспериментов использовали размноженные черенкованием в асептических условиях контрольные нетрансформированные растения рапса *Brassica napus* L. (Bn18, сорт Обрий) и экспрессирующие ген *desC* цианобактерии *S. vulcanus* линии растений (18a, 18b – первичные трансформанты, созданные на основе сорта Обрий; 18a/6, 18b/25 – растения первого поколения, полученные в результате самоопыления в теплице соответствующих первичных трансформантов), созданные нами ранее [12]. Для достижения одинакового физиологического состояния их выращивали в пробирках Sigma 25×150 мм (Sigma wave™) с 15 мл агаризованной питательной среды MS [14] в условиях термальной комнаты (16/8 фотопериод,

+22 °С) в течение трёх недель. Затем черенок с одним полностью развернувшимся листом пассировали на среду того же состава и продолжали выращивать в тех же условиях (21 сутки). Потом растения переносили в тех же пробирках в камеру (+4°С). Спустя 7 суток их возвращали для роста в термальную комнату на три недели. Рост оценивали на 21-е, 28-е, 35-е и 48-е сутки по накоплению сырой биомассы (СБ), содержанию суммарного растворимого белка (СРБ) и активности фермента супероксиддисмутазы (СОД) в листьях.

Определение СРБ выполняли по методу Bradford [15]. Пробы анализировали на фотометре BioPhotometer (Eppendorf, Германия). В качестве внутреннего стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Определение активности СОД в листьях проводили с использованием метода фотохимического окисления нитроглубого тетразолия белковыми экстрактами согласно [16]. Реакцию с нитроглубым тетразолием проводили в пробирках Eppendorf (1,5 мл). Одну пробирку для каждого образца оставляли в темноте, другую освещали в течение 5 мин в термостате при 23 °С лампой белого света (люминесцентная лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W). Количество конечного продукта реакции – формазана измеряли фотометрически (BioPhotometer Eppendorf, Германия) при длине волны 550 нм, оценивая оптическую плотность в реакционной смеси, выдержанной на свету, против оптической плотности пробы, выдержанной в темноте. Нулевая проба не содержала растительного экстракта. Активность выражали в ед. акт./ мг белка.

Статистическая обработка результатов проводилась оценкой разности средних (*t*-критерий Стьюдента) согласно [17]. Эксперименты выполняли в двух биологи-

ческих и четырёх аналитических повторностях.

Результаты и обсуждение

Размноженные в асептических условиях контрольные и трансформированные растения (рис. 1) использовали для оценки их устойчивости к низким положительным температурам.

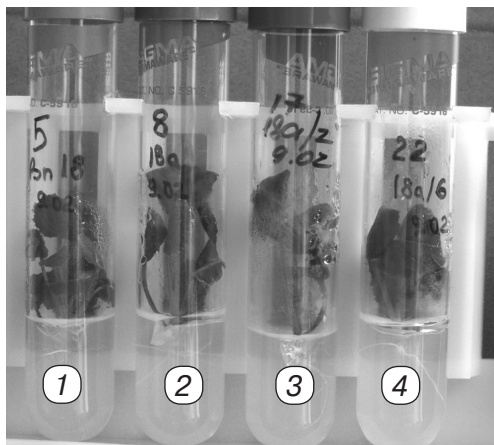


Рис. 1. Размноженные черенкованием в условиях асептической культуры контрольные (нетрансформированные) и экспрессирующие $\Delta 9$ десатуразу цианобактерии *S.vulcanus* растения рапса: 1 – Bn18, контроль, сорт Обрий; 2 – 18a – первичный трансформант; 3, 4 – трансформанты первого поколения линий 18a/2 и 18a/6

Анализируемые трансгенные растения рапса достоверно не отличались от контрольных по накоплению СБ при температуре +22 °С (рис. 2).

После роста при +4 °С СБ снижалась у всех тестируемых растений. При возвращении к первоначальному температурному режиму и трансгенные, и нетрансформированные растения в равной мере были способны формировать СБ. Оценка СБ позволяет выделить растения, устойчивые к стрессам. Так, растения рапса, экспрессировавшие транскрипционный фактор риса *Osm1b 4*, формировали СБ, на 15 % превышающую таковую у контрольных растений, при росте в условиях низкотем-

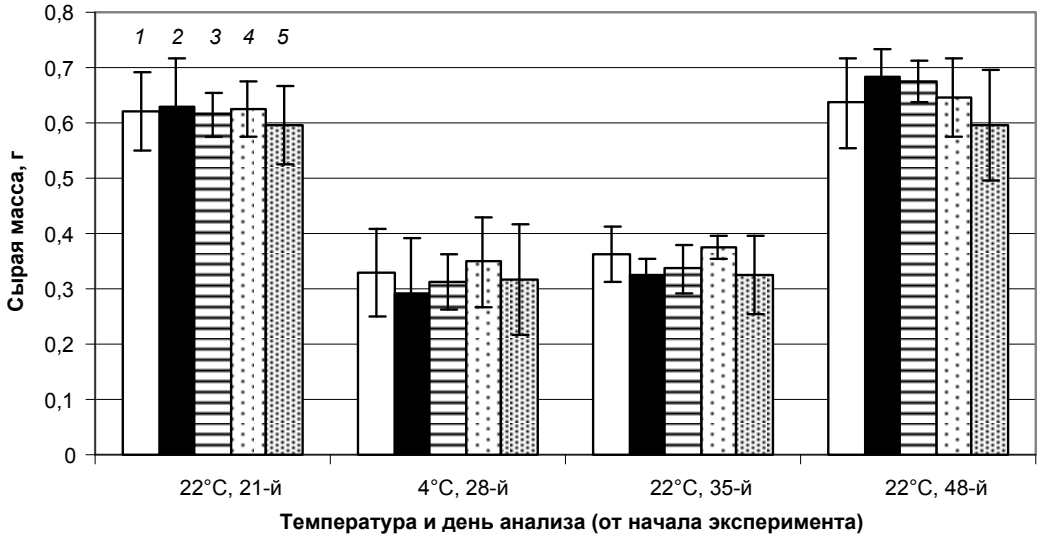


Рис. 2. Сырая масса растений рапса при разных температурных режимах выращивания в асептических условиях: 1 – контроль, нетрансформированные растения сорта Обрий; 2, 3 – первичные трансформанты линий 18а и 18b; 4, 5 – трансформанты первого поколения линий 18а/6 и 18b/25

пературного стресса (+4 °C) [18]. Уменьшение сырой массы у некоторых сортов риса (*Oryza sativa* L.) отмечено в условиях осмотического стресса, индуцированного маннитолом и NaCl [19]. Растения различных сортов рапса при поливе морской водой отличались между собой по уменьшению накопления СБ [20]. Уменьшение сухой биомассы, приводящее к уменьшению СБ, начиная с самого низкого уровня осмотического стресса, отмечено у растений пеларгонии (*Pelargonium*) различного происхождения [21]. Растения арахиса (*Arachis hypogaea* L.), экспрессировавшие изопентенилтрансферазу – ключевой фермент биосинтеза цитокининов – под контролем промотора SARK, который индуцируется созреванием и стрессом, давали почти в два раза больший урожай по сравнению с контрольными (нетрансформированными и регенерированными из культуры тканей) при умеренном водном дефиците в полевых условиях. Они не от-

личались от контрольных растений при достаточной влагообеспеченности [22].

В условиях без температурного стресса трансгенные растения рапса, экспрессирующие $\Delta 9$ ацил-липидную десатуразу цианобактерии *S. vulcanus*, достоверно не отличались от контрольных по СРБ (рис. 3). Не отмечено также отличий по этому параметру как в условиях роста при низкой положительной температуре, так и при возвращении растений в исходные условия выращивания. Содержание СРБ оставалось без изменений на протяжении всего эксперимента.

Накопление СРБ может характеризовать растения, устойчивые к неблагоприятным условиям. Так, показано, что у некоторых сортов рапса в условиях солевого стресса не наблюдалось изменений СРБ, тогда как у других он уменьшался [23]. Обработка аскорбиновой кислотой листьев рапса при солевом стрессе достоверно увеличивала содержание СРБ в листьях и корнях [24]. Растения рапса при поливе

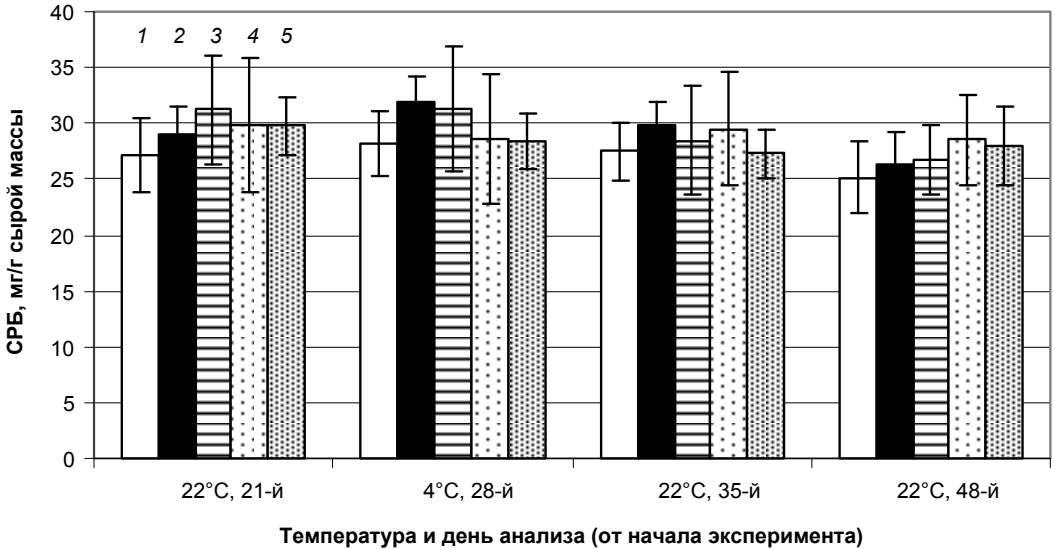
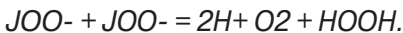


Рис. 3. Содержание суммарного растворимого белка в листьях растений рапса при разных температурных режимах выращивания в асептических условиях: 1 – контроль, нетрансформированные растения сорта Обрий; 2,3 – первичные трансформанты линий 18а и 18б; 4,5 – трансформанты первого поколения линий 18а/6 и 18б/25

морской водой накапливали больше СРБ [20].

Растения рапса с трансгеном *desC* были протестированы на активность одного из ферментов антиоксидантной системы растений – супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1). СОД – первый фермент процесса детоксикации активных форм кислорода, образующихся как в ходе присутствия растениями физиологических реакций, определяющих их рост и развитие (фотосинтез, дыхание), так и в результате стрессов различного происхождения. Он участвует в преобразовании супероксид аниона O_2^- в перекись водорода H_2O_2 :



Сверхэкспрессия гетерологической копии гена *sod* в растениях табака [25, 26], рапса [27], клевера [28] приводила к повышению их устойчивости к воздействию ряда неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе к пониженным температурам. Полученные нами растения рапса, экспрессирующие ген *сур11А1*,

кодирующий цитохром P450 животного происхождения, характеризовались повышенной активностью СОД в оптимальных условиях выращивания [29]. Они превосходили контрольные нетрансформированные растения по биомассе в условиях осмотического стресса, индуцированного маннитолом [30], а также проявляли повышенную устойчивость к кратковременному тепловому шоку [31].

В результате проведенных измерений выявлено, что активность СОД у анализируемых в данной работе трансгенных линий не отличалась от активности СОД контрольных растений как при нормальных условиях культивирования, так и в условиях низкотемпературного стресса (рис. 4). После 7 суток роста при +4 °С активность СОД повышалась у всех тестируемых растений, при возвращении к росту при +22 °С она снижалась до первоначального уровня.

Ранее было установлено, что ген десатуразы цианобактерии интегрирован в

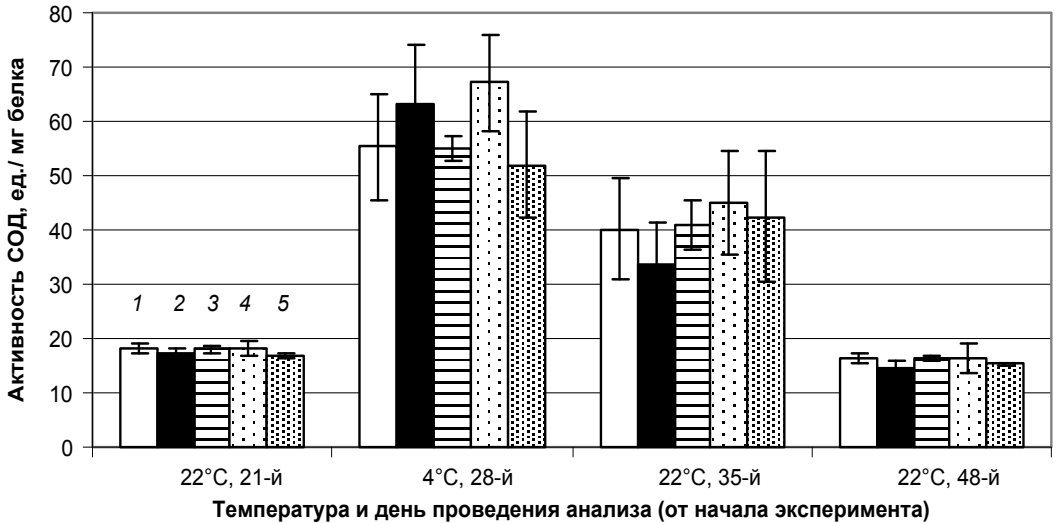


Рис. 4. Активность СОД в листьях растений рапса: 1- контроль, нетрансформированные растения сорта Обрий; 2, 3 – первичные трансформанты линий 18а и 18b; 4, 5 – трансформанты первого поколения линий 18а/6 и 18b/25

ядерный геном рапса и функционирует [12], что приводит к увеличению количества ненасыщенных жирных кислот [13]. Однако оказалось, что этого увеличения, которое происходит преимущественно за счет пальмитилолеиновой кислоты (С16:3, до 33%), недостаточно для повышения устойчивости к пониженным температурам. Возможно, работа данного фермента в эндоплазматическом ретикулуме неэффективна. Образование первой двойной связи в насыщенных жирных кислотах происходит преимущественно в хлоропластах. Для более существенного влияния вводимого гена $\Delta 9$ десатуразы на жирнокислотный состав липидов мембран, по-видимому, необходима доставка конечного продукта в хлоропласты, что можно осуществить путем введения в Т-ДНК вектора последовательности сигнального пептида. Следует отметить, что сообщалось о растениях табака, стабильно экспрессировавших трансген *desC* из *S. vulcanus* в результате агробактериальной трансформации, которые характери-

зовались повышением устойчивости к холоду [6], хотя не было свидетельств хлоропластного таргетинга введенного гена. Возможно, изменения в составе жирных кислот этих растений более существенны для них как растений теплолюбивых. Для рапса, вероятно, они должны быть более радикальными.

Выводы

Растения рапса, в которых происходит экспрессия десатуразы *DesC* цианобактерии без компартиментализации в хлоропластах, не отличаются от исходных нетрансформированных растений по накоплению СБ, содержанию СРБ и активности СОД при выращивании в условиях асептической культуры при температуре +22 °С, при переносе их для роста на +4 °С, а также при возврате к исходным температурным условиям (+22 °С). Они не изменяют свою устойчивость к низким положительным температурам.

Работа финансировалась в рамках проекта №0110U006062

Список литературы

1. Los D.A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // Biochim Biophys Acta. – 1998.–Vol. 1394, № 1. – P.3–15.
2. Граскова И.А., Дударева Л.В., Живетьев М.А., Столбикова А.В., Соколова Н.А., Войников В.К. Динамика сезонных изменений жирнокислотного состава, степени ненасыщенности жирных кислот и активности ацил–липидных десатураз в тканях некоторых лекарственных растений, произрастающих в условиях Предбайкалья // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – С. 223–230.
3. Макаренко С.П., Дударева Л.В., Катышев А.И., Коненкина Т.А., Назарова А.В., Рудиковская Е.Г., Соколова Н.А., Черникова В.В., Константинов Ю.М. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков// Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 6. – С. 482–488.
4. Ishizaki–Nishizawa O., Fujii T., Azuma M., Sekiguchi K., Murata N., Ohtani T. & Toguri T. Low–temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase // Nature Biotechnology. – 1996. – Vol. 14, № 8. – P.1003–1006.
5. Craig W., Lenzi P., Scotti N., De Palma M., Saggese P., Carbone V., McGrath Curran N., Magee A. M., Medgyesy P., Kavanagh T. A. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance // Transgenic Res. – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 769–782.
6. Orlova I.V., Serebriiskaya T.S., Popov V., Merkulova N., Nosov A.M., Trunova T. I., Tsydendambaev V. D., Los D. A. Transformation of Tobacco with a Gene for the Thermophilic Acyl–Lipid Desaturase Enhances the Chilling Tolerance of Plants // Plant Cell Physiol. – 2003. – Vol. 44, № 4. – P. 447–450.
7. Kodama H., Hamada T., Horiguchi C., Nishimura M., Iba K. Genetic Enhancement of Cold Tolerance by Expression of a Gene for Chloroplast W–3 Fatty Acid Desaturase in Transgenic Tobacco// Plant Physiol. – 1994. – Vol. 105, № 2. – P. 601–605.
8. De Palma M., Grillo S., Massarelli I., Costa A., Balogh G., Vigh L., Leone A. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants// Mol. Breeding. – 2008. – Vol. 21, № 1. – P. 15–26.
9. Maali A.R., Goldenkova–Pavlova I.V., Pchelkin V.D., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. Acyl–lipid $\Delta 12$ –desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologia. – 2007. – Vol. 53, № 2. – P. 4–7.
10. Шимшилашвили Х.Р. Изучение экспрессии генов, вовлечённых в модификацию жирных кислот, на экспериментальных моделях // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М.: ИОГ РАН, 2010. – 24 с.
11. Sakhno L. A., Gocheva E. A., Komarnitskii I. K., Kuchuk N. V. Stable expression of the promoterless *bar* gene in transformed rapeseed plants // Cytology and Genetics. – 2008. –Vol. 42, № 1.– P. 16–22.
12. Сахно Л.А., Герасименко И.М., Комарницкий И.К., Шелудько Ю.В., Голденкова–Павлова И.В. Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу *DesC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* // Biopolym.& Cell. – 2012. – Vol. 28, № 6. – P. 449–455.
13. Сахно Л.А., Сливец М.С., Остапчук А.Н., Король Н.А., Шелудько Ю.В., Голденкова–Павлова И.В. Рапс с трансгеном *DesC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus*: жирнокислотный состав листьев // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: X междунар. конф: сб. ст., Казань, 14–18 октября 2013 года. – Казань: Центр инновационных технологий, 2013. – С. 94–98.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding// Anal.Biochem. – 1976. – Vol. 72, № 2. – P. 248 – 254.
16. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions// Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 161, № 2. – P. 559 – 566.
17. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа. – 1990. – 352 с.
18. Goma A.M., Raldugina G. N., Burmistrova N. A., Radionov N. V., Kuznetsov V. V. Response of Transgenic Rape Plants Bearing the *Osm4* Gene from Rice Encoding a Trans–Factor to Low Above–Zero Temperature // Russian Journal of Plant Physiology. – 2012. – Vol. 59, № 1. – P.105–114.
19. Cha–Um S., Nhung N.T.H., Kirdmanee C. Effect of mannitol– and salt–induced isoosmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) // Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42, № 2. – P.927–941.

20. Latef A.A.H.A. Ameliorative effect of calcium chloride on growth, antioxidant enzymes, protein pattern and some metabolic activity of canola (*Brassica napus* L.) under seawater stress// J.Plant Nutrition. – 2011. – Vol. 34, № 9. – P.1303–1320.
21. Hassanein A.M.A. Establishment of Efficient *in vitro* Method for Drought Tolerance Evaluation in *Pelargonium* // J. Horticult. Sci. & Ornamental Plants. – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 8–15.
22. Qin H., Gu Q., Zhang J., Sun L., Kuppu S., Zhang Y., Burow M., Payton P., Blumwald E., Zhang H. Regulated Expression of an Isopentenyltransferase Gene (*IPT*) in Peanut Significantly Improves Drought Tolerance and Increases Yield Under Field Conditions // Plant Cell Physiol. – 2011. – Vol. 52, № 11. – P. 1904–1914.
23. Qasim M., Ashraf M., Ashraf M.Y., Rehman S. U., Rha E.S. Salt-Induced Changes in Two Canola Cultivars Differing in Salt Tolerance // Biologia Plantarum. – 2003. – Vol. 46, № 4. – P. 629–632.
24. Dolatabadian A., Sanavy S. A. M. M., Chashmi N. A. The Effects of Foliar Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation and Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress // J.Agronomy and Crop Science. – 2008. – Vol. 194, № 3. – P. 206–213.
25. Gupta S.A., Heinen J.I., Holaday A.S., Burke J.J., Allen R.D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90, № 4. – P. 1629–1633.
26. Gupta S.A., Webb R.P., Holaday A.S., Allen R.D. Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress (Induction of Ascorbate Peroxidase in Superoxide Dismutase–Overexpressing Plants)// Plant Physiol. – 1993. – Vol. 103, № 4. – P. 1067–1073.
27. Gusta L.V., Benning N.T., Wu G., Luo X., Liu X., Gusta M.L., McHughen A. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // Mol. Breeding. – 2009. – Vol. 24, № 2 – P. 103–115.
28. McKersie B.D., Bowley S.R., Jones K.S. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase// Plant Physiology. – 1999. – Vol. 119, № 3. – P. 839–847.
29. Сахно Л.А., Моргун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения// Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 5. – С. 74–82.
30. Трегуб М.С., Сахно Л.А. Особенности роста трансгенных растений рапса с геном *СУР11А1* цитохрома P450_{SCC} в условиях осмотического стресса // Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології (за ред. Кунаха В.А.). – 2012. – Т. 4. – С. 623–628.
31. Sakhno L., Slyvets M., Korol N., Karbovska N., Ostapchuk A., Kuchuk M. Short-term heat stress effects on a *суп11А1* canola plants// 6th Conference of the PSEPB. – September 16–19, 2013. – Łódź, Poland. – Biotechnologia. – 2013. – Vol. 94, № 3. – P. 409.

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 5.08.2013

ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСГЕНА *desC* ЦІАНОБАКТЕРІЇ В РОСЛИНАХ РІПАКУ НЕ ЗМІНЮЄ ЇХНЬОЇ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ

М.С. Сливец^{1,2}, Л.О. Сахно¹, Ю.В. Шелудько¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: sakhno@icbge.org.ua

² Національний технічний університет України «Київський Політехнічний Інститут»
Україна, 03056, Київ, проспект Перемоги, 37

Мета. Тестування створених раніше рослин ріпаку, що експресують ген $\Delta 9$ (*desC*) ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії *Synechococcus vulcanus*, злитий в одній рамці зчитування з репортерним геном термостабільної ліхенази (*licM3*) *Clostridium thermocellum*, в асептичних умовах за дії низьких позитивних температур. **Методи.** Вимірювання сирової біомаси (СБ), вмісту сумарного розчинного білка (СРБ) і активності супероксиддисмутази (СОД) у тканинах листків. **Результати.** Рослини ріпаку (попередньо розмножені черенкуванням в культурі *in vitro* контрольні (нетрансформовані) та трансгенні з геном *DesC*) достовірно не відрізнялись між собою за СБ, вмістом СРБ і активністю СОД протягом вирощування за температури +22 °С, після переносу їх для росту на +4 °С, а також при поверненні до вихідних температурних умов (+22 °С). **Висновки.** Рослини ріпаку, в яких відбувається експресія *DesC* ціанобактерії без компартаменталізації в хлоропластах, не змінюють своєї толерантності до низьких пози-

тивних температур порівняно з нетрансформованими рослинами.

Ключові слова: *Brassica napus* рапак, десатурази, *desC*, СОД, цианобактерія, низькі позитивні температури.

EXPRESSION OF CYANOBACTERIUM *desC* TRANSGENE DOES NOT CHANGE CANOLA PLANT COLD RESISTANCE

M.S. Slyvets^{1,2}, L.O. Sakhno¹, Y.V. Sheludko¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho str., 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua

² National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute",
Ukraine, Kyiv, 03056, Peremogy prospect, 37

Aim. Canola plants which were obtained earlier expressing *Synechococcus vulcanus desC* transgene growth testing under low positive

temperatures in aseptic culture. Target gene was fused with reporter *licBM3* (thermostable lichenase) of *Clostridium thermocellum* gene in one reading frame. **Methods.** Measurement of fresh weight (FW), total soluble protein content (TSP) and superoxide dismutase (SOD) activity in leaf tissues. **Results.** Control (nontransformed) and *desC* canola plants which were previously propagated by grafting *in vitro* did not differ significantly on FW, TSP content and SOD activity during growth under +22 °C, when temperature was changed to +4 °C, and after returning to initial temperature conditions (+22 °C). **Conclusions.** Canola plants expressing *DesC* of cyanobacterium without chloroplast compartmentalization do not change their tolerance to low positive temperature in comparison with nontransformed ones.

Key words: *Brassica napus* canola, cyanobacterium, desaturases, *desC*, SOD, low positive temperature.