

УДК 602.6:581.19:57.045

С. М. САВИНА, Т. А. ГАПЕЕВА, А. В. ЗАЙЦЕВА, Т. Г. ТРЕТЬЯКОВА,  
И. А. ДРЕМУК, Н. Г. АВЕРИНА

### НАКОПЛЕНИЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ХЛОРОФИЛЛА И КАРОТИНОИДОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА С ГЕНОМ АЛК-СИНТЕТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
e-mail: [ibce@ibp.org.by](mailto:ibce@ibp.org.by)

Создано три линии трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 (линии 1.1, 1.3 и 1.7), экспрессирующих рекомбинантный ген *Saccharomyces cerevisiae* АЛК-синтетазы, который содержит последовательность сигнального пептида для транспорта синтезируемого в цитоплазме фермента в митохондрии, и одна линия трансформантов (2.1), экспрессирующих ген АЛК-синтетазы, синтезируемой и локализованной в цитоплазме. Все полученные трансгенные растения обладали повышенной АЛК-синтезирующей способностью и характеризовались улучшенными ростовыми показателями. В растениях линии 2.1 отмечено также повышенное по сравнению с растениями дикого типа содержание фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов.

Созданные трансгенные растения могут быть использованы в качестве модели для исследования роли умеренно повышенного уровня эндогенной АЛК в усилении фотосинтетической активности хлоропластов, а также в формировании стрессоустойчивых растений, что будет способствовать созданию биотехнологически улучшенных сортов сельскохозяйственных культур.

*Ключевые слова:* табак, трансгенные растения, 5-аминолевулиновая кислота, АЛК-синтетаза, АЛК-синтезирующая способность, хлорофилл, каротиноиды.

S. M. SAVINA, T. A. GAPEEVA, A. V. ZAITSEVA, T. G. TRETYAKOVA, I. A. DREMUK, N. G. AVERINA

### ACCUMULATION OF 5-AMINOLEVULINIC ACID, CHLOROPHYLL AND CAROTENOIDS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH YEAST ALA-SYNTASE GENE

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,  
e-mail: [ibce@ibp.org.by](mailto:ibce@ibp.org.by)

Three lines of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) expressing recombinant *Saccharomyces cerevisiae* ALA-synthase gene that contains an information for targeting peptide providing penetration of the enzyme to mitochondria (lines 1.1, 1.3, 1.7) and one line expressing gene of the ALA-synthase that is synthesized and localized in cytoplasm were obtained (line 2.1). All transgenic plants possessed by increased ALA-synthesizing ability and were characterized by improved growth parameters. Higher content of photosynthetic pigments – chlorophyll and carotenoids as compared to wild-type plants was also registered in plants of the line 2.1.

The received transgenic plants can serve as model for research of a role of endogenous ALA in providing photosynthetic activity of chloroplast and forming of plant stress resistance that will be used for creating the biotechnologically improved cultivars.

*Keywords:* tobacco, transgenic plants, 5-aminolevulinic acid, ALA-synthase, ALA-synthesizing ability, chlorophyll and carotenoids.

**Введение.** Являясь первичным предшественником тетрапиррольных соединений, таких как хлорофилл и гем [1, 2], 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) способна выступать также в роли физиологического регулятора роста и развития растений [1]. В низких концентрациях (0,06–0,6 мМ) экзогенная АЛК оказывает положительное влияние на продуктивность целого ряда сельскохозяйственных культур – ячменя, винограда, капусты, льна-долгунца и др. [1–7]. Механизмы повышения продуктивности растений под действием АЛК в настоящее время интенсивно изучаются. Установлено, что АЛК стабилизирует ряд ферментов, участвующих в биосинтезе хлорофилла

[8], способствует повышению содержания эндогенных цитокининов [1, 9], стимулирует экспрессию гена нитратредуктазы, усиливая тем самым ассимиляцию неорганического азота [10], а также повышает устойчивость растений к некоторым стрессовым факторам окружающей среды, таким как засоление [11, 12], засуха [6] и низкие температуры [13]. Имеются данные, что в условиях окислительного стресса в растениях, обработанных экзогенной АЛК, происходит активация основных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза и каталазы), что приводит к снижению интенсивности окислительных процессов [14].

Образование АЛК в высших растениях и водорослях осуществляется в пластидах из глутаминовой кислоты и катализируется тремя ферментами: глутамил-тРНК<sup>Глу</sup>-синтетазой, глутамил-тРНК<sup>Глу</sup>-редуктазой (ГР) и глутамат-1-полуальдегидаминотрансферазой (ГАТ) (С-5 путь) [1]. Биосинтез АЛК в нефотосинтезирующих организмах ( $\alpha$ -подгруппе протеобактерий, дрожжах, грибах, клетках животных и др.) происходит в митохондриях из глицина и сукцинил-КоА в реакции, катализируемой АЛК-синтетазой (С4-путь) [1].

Образование АЛК является ключевым и одновременно лимитирующим звеном в образовании тетрапирролов [1]. Показано, что увеличения содержания эндогенной АЛК в растительной клетке можно добиться путем включения в ядерный геном растений гена дрожжевой АЛК-синтетазы, содержащего последовательность лидерного пептида для транспорта фермента в хлоропласты [15]. Однако известно, что в больших концентрациях АЛК может запускать на свету деструктивные фотодинамические реакции в растительной клетке. Так, интродукция в геном риса гена АЛК-синтетазы *Bradyrhizobium japonicum* привела к созданию трансгенных растений с повышенным содержанием в хлоропластах как АЛК (на 45–85 % более высоким по сравнению с диким типом), так и сильнее фотосенсибилизатора – протопорфирина IX, содержание которого в 2–3 раза превышало таковое в контрольных растениях [16]. При этом на свету все линии трансформированных растений обладали повышенной фоточувствительностью: листья обесцвечивались, в них увеличивалось содержание продуктов перекисного окисления липидов, снижалась активность фотосистемы 2 [16]. Результаты этой работы свидетельствуют об опасности передозировки снабжения хлоропласта дополнительной АЛК. Таким образом, актуальной задачей является создание систем экспрессии гена АЛК-синтетазы в клетках растений, обеспечивающих локализацию дополнительной АЛК вне хлоропластов, где она не будет участвовать в синтезе тетрапирролов-фотосенсибилизаторов, но будет проявлять указанные выше защитные и стимулирующие свойства в естественном для растений световом режиме.

Цель данной работы – создание трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) с экспрессируемым геном АЛК-синтетазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обеспечивающим синтез функционально активной АЛК-синтетазы, исследование физиолого-биохимических эффектов экспрессии гена АЛК-синтетазы в трансформированных растениях, в частности их способности к накоплению эндогенной АЛК и ее использованию в синтезе фотосинтетических пигментов, а также выявление различий между трансгенными растениями и растениями дикого типа по морфометрическим показателям.

**Материалы и методы исследования.** Генетические конструкции для агробактериальной трансформации. Плазмиды (pALAS и pALASC) на основе вектора pBINAR, содержащие рекомбинантные гены для экспрессии АЛК-синтетазы *Saccharomyces cerevisiae* в клетках растений, были любезно предоставлены профессором Б. Гриммом (Университет им. Гумбольдта, Германия). Кассета для экспрессии в растениях вектора pBINAR содержит конститутивный промотор CaMV 35S и терминатор гена октопинсинтетазы, между которыми находится полилинкер для клонирования фрагментов ДНК. Последовательности кДНК АЛК-синтетазы дрожжей [17, 18] клонированы по сайту SmaI полилинкера вышеописанной кассеты с получением бинарных векторов для агробактериальной трансформации pALAS и pALASC. Плазмида pALAS содержит в составе рекомбинантного гена полноразмерную кДНК *Saccharomyces cerevisiae* с сигнальной последовательностью, кодирующей лидерный пептид для транспорта синтезируемого в цитоплазме фермента в митохондрии, в то время как в плазмиде pALASC использована кДНК АЛК-синтетазы дрожжей без сигнальной последовательности митохондриального лидерного пептида. Следует отметить, что ни один из вышеуказанных рекомбинантных генов не содержит сигнальной

последовательности, кодирующей лидерный пептид для транспорта синтезируемой в цитоплазме АЛК-синтетазы в хлоропласты. Каждый бинарный вектор содержит также селективный маркерный ген неомидинфосфотрансферазы (NPTII), определяющий устойчивость трансгенных растений к канамицину, что позволяет отбирать трансгенные растения при добавлении канамицина в агаризованную среду выращивания. При проведении генетической трансформации растений табака использовали агробактериальные штаммы AGLO::pALAS и AGLO::pALASC. Бинарные векторы были введены в клетки агробактерий штамма AGLO методом трансформации [19].

**Трансформация листовых дисков табака.** Для трансформации использовали 6–8-недельные стерильные растения табака (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1), которые культивировали *in vitro* при температуре 18–23 °С с 16/8-часовым фотопериодом (200 мкм м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша) на агаризованной (0,8 %) среде MS с добавлением витаминов Murashige and Scoog Vitamin powder 1000x (Sigma, 1 мкл/мл) и 0,1 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК) [20]. Трансформацию растений табака осуществляли методом инокуляции листовых дисков агробактериями [21]. Непосредственно перед трансформацией осуществляли посев агробактерий в стандартную жидкую среду без антибиотиков и культивировали их в термошейкере при 28 °С [21]. Полученную суспензию агробактерий (25 мл) втирали шпателем в предварительно размещенную на чашке Петри агаризованную (0,8 %) среду MS, содержащую 3 %-ную сахарозу. Листовые диски молодых, полностью сформированных листьев табака диаметром 1 см стерилизовали 5–10 мин в 5 %-ном растворе средства Асе (содержание хлора – 0,25 %), затем помещали на чашки Петри верхней стороной вниз для сокультивации с агробактериями на 48 ч при 25 °С. С целью каллусообразования листовые диски переносили на чашки Петри со средой СИМ (0,8 %-ная агаризованная среда MS, содержащая витамины, 3 %-ную сахарозу, 0,1 мг/л НУК, 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 50 мг/л канамицина и 150 мг/л тиментина) и культивировали в условиях 16-часового фотопериода (200 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) при температуре 19–21 °С. Экспланты помещали на свежеприготовленную среду СИМ каждые 2 недели до образования хорошо сформировавшихся каллусов, которые затем отделяли от эксплантов и переносили на среду СИМ, стимулирующую побегообразование (0,8 %-ная агаризованная среда MS, содержащая витамины, 1 %-ную сахарозу, 1,0 мг/л БАП, 50 мг/л канамицина и 150 мг/л тиментина). Каллусы пересаживали на свежеприготовленную среду СИМ каждые 2 недели до образования побегов. Образовавшиеся побеги высотой 1–2 см переносили для укоренения в пробирки со средой РИМ (0,8 %-ная агаризованная среда MS, содержащая витамины, 1 %-ную сахарозу, 0,5 мг/л БАП, 50 мг/л канамицина и 150 мг/л тиментина). Растения с агаризованных сред пересаживали в почву. Дальнейший отбор и анализ трансформированных растений поколений T0 и T1 проводили методом ПЦР.

Праймеры, использованные для анализа, были разработаны с помощью программ Vector NTI (Life Technologies, Invitrogen) и Primer-BLAST (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Локализация
ALA3S*	5' – atgcgtccatgattgtcggt	Ген АЛК-синтетазы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALA3A*	5' – atttctagaggctgcgacg	
NPTS*	5' – cttgctcctgccgagaaagtatcc	Кодирующая область гена неомидинфосфотрансферазы из T-области используемого бинарного вектора
NPTA*	5' – cggcaagcaggcatcgccatgtgtc	
ActNT1S*	5' – gccagtgccgtacaaca	Ген актина <i>Nicotiana tabacum</i>
ActNT1A*	5' – gaaacgttcagcaccgatgg	

\*S, A – прямой и обратный праймеры соответственно.

Суммарную растительную ДНК выделяли при помощи набора NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя.

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Sigma-Aldrich, США) по протоколу фирмы-производителя, кДНК синтезировали с помощью AMV-обратной транскриптазы (Thermo Scientific, Fermentas) и олиго-dT<sub>18</sub> праймера. Для определения пригодности кДНК для РНК-ПЦР использовали праймеры на ген актина.

Семена отобранных линий табака поколения Т1 высевали в почву (грунт «Родничок», Беларусь), растения выращивали под люминесцентными лампами белого света TL-D 36W/765 Philips в режиме 14 ч света (интенсивность 200 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) и 10 ч темноты при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности воздуха 50–60 % в течение 45 дней. Дальнейшие исследования проводили на 3–4-м листе 45-дневных растений табака. В качестве контроля использовали растения, не подвергавшиеся генетической трансформации (дикий тип).

*Определение накопления эндогенной АЛК.* Высечки листьев табака инкубировали 6 ч на свету или в темноте на 0,05 М растворе левоулиновой кислоты в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 7,0). Пробы фиксировали жидким азотом, растирали в фарфоровой ступке до гомогената в 1 мл 5 %-ной 3-хлоруксусной кислоты (ТХУ) и переносили в центрифужные пробирки, после чего ступку промывали повторно 1 мл 5 %-ной ТХУ и объединяли с гомогенатом. Пробирки с гомогенатом нагревали на водяной бане при температуре 100 °С в течение 15 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 13 000 g (центрифуга MINI ScanSpeed, LaboGene). Супернатант сливали в мерные пробирки. Осадок промывали 1 мл 1 М ацетатного буфера (рН 4,6) и осаждали в том же режиме. Объединенный супернатант после доведения рН до 4,6 с помощью ледяной уксусной кислоты конденсировали с 3 каплями ацетилацетона в течение 15 мин при температуре 100 °С. После охлаждения к 0,5 мл супернатанта добавляли 0,5 мл модифицированного реактива Эрлиха [22] и через 15 мин определяли оптическую плотность раствора при 553 нм на спектрофотометре Uvikon 931. При расчете количества АЛК использовали молярный коэффициент экстинкции 6,8·10<sup>4</sup> М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> [23]. Контрольные образцы для измерений содержали 0,25 мл 5 %-ной ТХУ, 0,25 мл 1 М ацетатного буфера, 1 каплю ацетилацетона и 0,5 мл реактива Эрлиха.

*Количественное определение хлорофилла и каротиноидов.* Содержание хлорофиллов (a, b) и каротиноидов в листьях табака определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Экстракцию пигментов проводили из свежего растительного материала 100 %-ным ацетоном, содержащим СаСО<sub>3</sub>, из расчета 0,1 г навески листьев на 2 мл ацетона и 100 мг СаСО<sub>3</sub>. Разделение пигментов осуществляли на хроматографе LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), применяя колонку 5 мкм Nucleodur C18 Gravity (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG, Германия) длиной 15 см. В качестве элюента А использовали раствор, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % бидистиллированной Н<sub>2</sub>О и 0,1 % триэтиламина, в качестве элюента В – 100 %-ный этилацетат. Идентификацию и анализ содержания пигментов проводили по времени удерживания и спектрам поглощения выявленных пиков согласно работе [24].

*Статистическая обработка результатов измерений.* Для анализа содержания эндогенной АЛК и пигментов отбирали по 10–15 индивидуальных трансгенных растений каждой линии, а также растений дикого типа. Каждый эксперимент проводили в трехкратной биологической повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью программ SigmaPlot 10.0 (Systat Software, США) и Excel 2010 (Microsoft, США). Оценивали среднюю квадратичную ошибку среднего арифметического.

**Результаты и их обсуждение.** В результате агробактериальной трансформации растений табака были получены 4 линии трансгенных растений, экспрессирующих ген дрожжевой АЛК-синтетазы (линии 1.1, 1.3, 1.7 – с использованием бинарной системы AGLO::pALAS, а также линия 2.1 – с использованием AGLO::pALASC). Следует отметить, что трансгенные растения табака с рекомбинантным геном АЛК-синтетазы, не содержащим последовательности, кодирующей сигнальный пептид для транспорта синтезируемого в цитоплазме фермента в митохондрии или в хлоропласты (плазмида pALASC), были созданы впервые. На рис. 1, 2 представлены результаты ПЦР-анализа трансформированных растений табака поколений Т0 и Т1 соответственно. Данные, приведенные на рис. 1, подтверждают наличие экспрессии (мРНК-транскриптов) целевого и маркерного гена (NPTII) в клетках трансформированных растений поколения Т0. Анализ генетического расщепления показал, что геномы созданных линий трансгенных растений (1.1, 1.3, 1.7 и 2.1) поколения Т1 содержат более одной вставки трансгена (рис. 2).

Для подтверждения синтеза функционально активной дрожжевой АЛК-синтетазы была проанализирована способность листьев трансгенных растений табака образовывать АЛК на свету и в темноте в присутствии левоулиновой кислоты – потенциального ингибитора АЛК-дегидратазы.

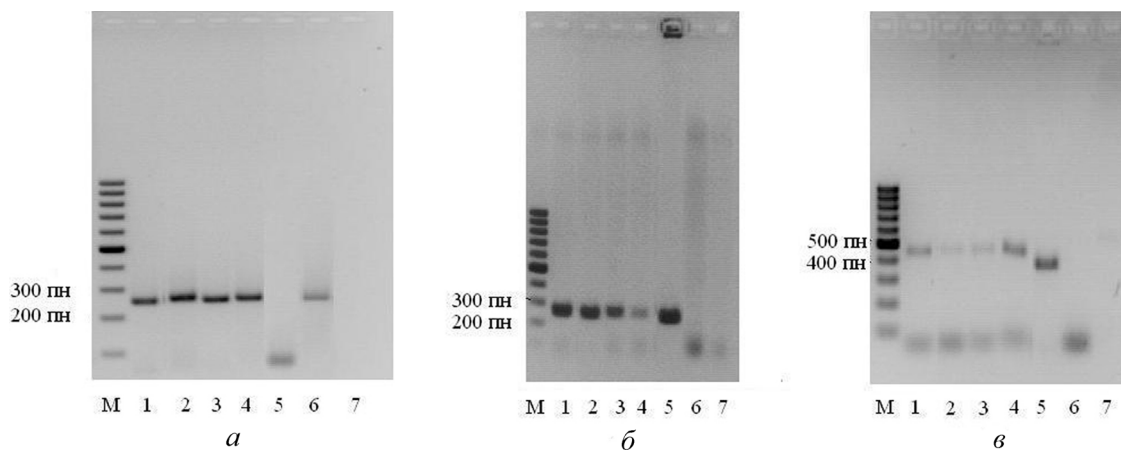


Рис. 1. Результаты кДНК-ПЦР-анализа трансформированных растений табака поколения T0 с праймерами для гена актина (а), гена NPTII (б), гена АЛК-синтетазы (в); 1-4 – линии 1.1, 1.3, 1.7 и 2.1; 5 – AGL0::pALAS; 6 – дикий тип; 7 – контроль без матрицы, М – GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

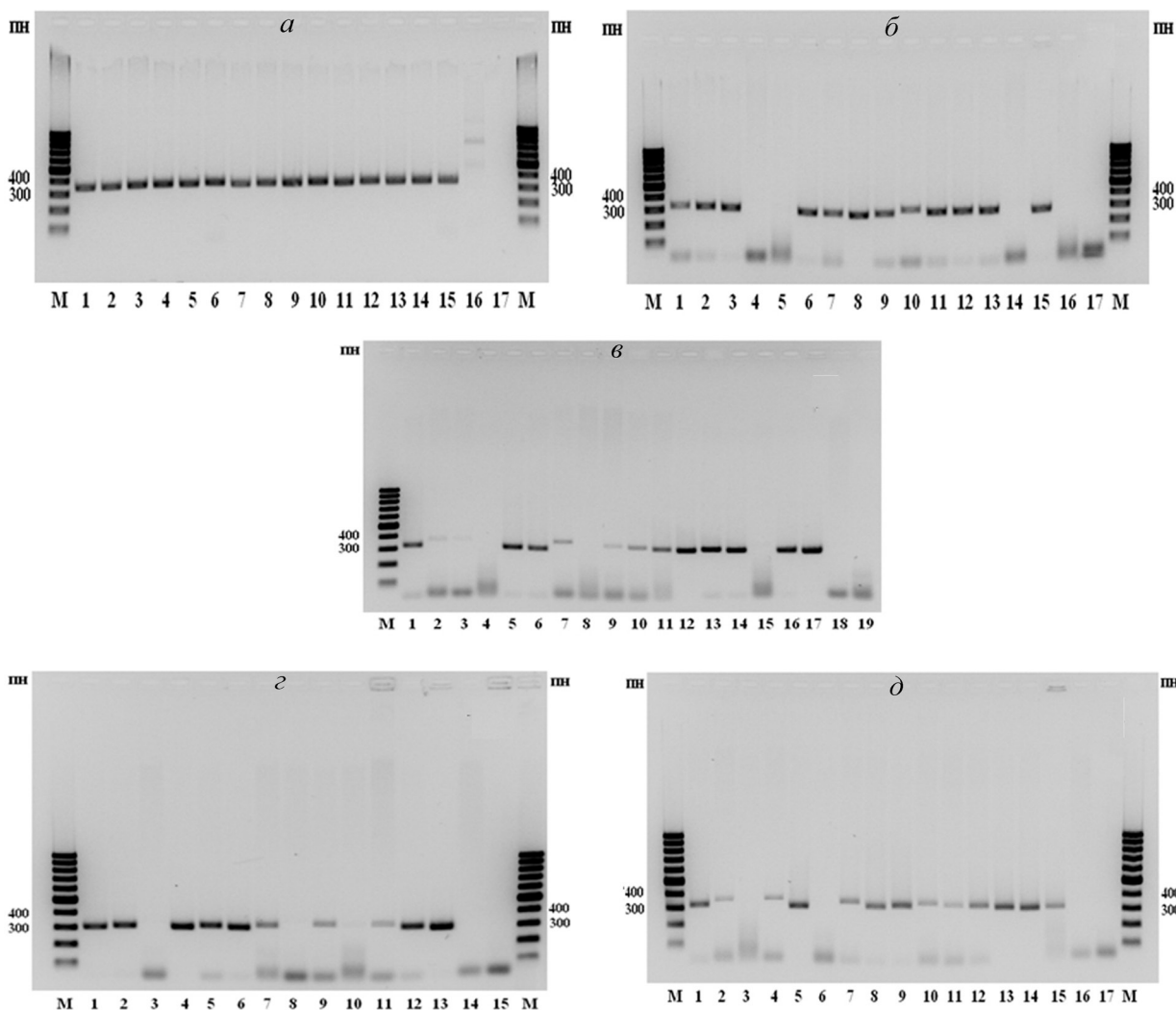


Рис. 2. Результаты кДНК-ПЦР-анализа трансформированных растений табака поколения T1 с праймерами для гена актина (а), гена АЛК-синтетазы (б, в, з, д – в линиях 1.1, 1.3, 1.7 и 2.1 соответственно); а, б, д: 1-14 – индивидуальные растения каждой линии, 15 – AGL0::pALAS (для а и б) и AGL0::pALASC (для д), 16 – дикий тип, 17 – контроль без матрицы; в: 1-16 – индивидуальные растения линии 1.3, 17 – AGL0::pALAS, 18 – дикий тип, 19 – контроль без матрицы; з: 1-12 – индивидуальные растения линии 1.7, 13 – AGL0::pALAS, 14 – дикий тип, 15 – контроль без матрицы. М – GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

Результаты исследования показали, что на свету все исследуемые линии трансгенных растений обладали повышенной АЛК синтезирующей способностью по сравнению с диким типом (табл. 2).

Так, способность накапливать АЛК у линий 1.1, 1.3, 1.7 и 2.1 превысила соответствующий показатель в листьях дикого типа на  $48 \pm 5$ ,  $37 \pm 8$ ,  $33 \pm 6$  и  $34 \pm 8$  % соответственно, что может указывать на функционирование в трансформантах дрожжевой АЛК-синтетазы.

Т а б л и ц а 2. АЛК-синтезирующая способность на свету (АЛК (свет)) и в темноте (АЛК (темнота)), содержание хлорофилла ( $a + b$ ) и каротиноидов в растениях табака, трансформированных геном дрожжевой АЛК-синтетазы (линии 1.1–2.1), и в растениях дикого типа (ДТ)

Линия	АЛК (свет), нмоль/г сырой массы	АЛК (темнота), нмоль/г сырой массы	АЛК (свет)/ АЛК (темнота)	Хлорофилл ( $a+b$ ), % к контролю	Каротиноиды, % к контролю
ДТ	$43,32 \pm 4,00$ (100)*	$1,65 \pm 0,23$ (100)*	26,3	100	100
1.1	$64,06 \pm 2,91$ (148)*	$1,98 \pm 0,23$ (120)*	32,4	$101 \pm 2$	$98 \pm 4$
1.3	$59,31 \pm 3,93$ (137)*	$1,54 \pm 0,16$ (93)*	38,5	$106 \pm 6$	$104 \pm 6$
1.7	$57,94 \pm 3,57$ (134)*	$1,84 \pm 0,37$ (112)*	31,5	$101 \pm 17$	$106 \pm 17$
2.1	$58,24 \pm 3,75$ (134)*	$2,02 \pm 0,13$ (122)*	28,8	$118 \pm 4$	$121 \pm 5$

\*В скобках указано процентное содержание по сравнению с ДТ.

Наряду с этим была определена способность листьев выбранных линий накапливать АЛК и в темноте (табл. 2). В результате функционирования механизмов, ограничивающих синтез АЛК в темноте из-за снижения уровня экспрессии генов ГР и ГАТ, окисления субстрата ГР – молекул тРНК<sup>ГЛУ</sup>, а также накопления ретроингибитора ГР – молекул протохлорофиллида [1] скорость накопления АЛК при переносе растений дикого типа со света в темноту снизилась в 26,2 раза. Затемнение трансгенных растений привело к несколько большему падению скорости накопления АЛК во всех изученных линиях по сравнению с таковой у растений дикого типа (табл. 2). Это может указывать на функционирование в трансформированных растениях дополнительного светозависимого механизма, контролирующего накопление АЛК с помощью дрожжевой АЛК-синтетазы. Ранее светозависимость функционирования АЛК-синтетазы наблюдали в экстрактах клеток *Rhodospseudomonas sphaeroides* и *Rhodospirillum rubrum* [25]. Из табл. 2 видно, что листья трансформированных растений линий 1.1 и 2.1 обладают повышенной по сравнению с растениями дикого типа способностью синтезировать АЛК в условиях темноты (на 20 и 22 % соответственно). Такая же тенденция отмечается и у растений линии 1.7 (увеличение на 12 %). В целом совокупность полученных данных может свидетельствовать об образовании в исследуемых трансгенных растениях дополнительной АЛК за счет дрожжевой АЛК-синтетазы.

Трансгенные линии были также охарактеризованы по содержанию фотосинтетических пигментов – хлорофилла ( $a+b$ ) и каротиноидов. Самое высокое содержание пигментов было зафиксировано в трансформированных растениях линии 2.1: сумма хлорофилла ( $a + b$ ), а также каротиноидов в них превысила соответствующие значения в диком типе на  $18 \pm 4$  и  $21 \pm 5$  % соответственно (табл. 2). Содержание отдельных каротиноидов – лютеина, неоксантина, пигментов ксантофилового цикла (виолаксантина, антраксантина) и  $\beta$ -каротина в растениях линии 2.1 также оказалось выше, чем в контроле (табл. 3). В листьях трансформантов линий 1.1, 1.3 и 1.7 количество хлорофилла ( $a + b$ ) и каротиноидов практически не отличалось от контрольного уровня.

Полученные результаты показывают, что растения табака с функционально активной дрожжевой АЛК-синтетазой (линии 1.1, 1.3, 1.7 и 2.1), выращенные под белым светом люминесцентных ламп ( $200 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ ), не проявляют внешних признаков фотообесцвечивания, о чем свидетельствует отсутствие в них фотодеструкции хлорофиллов ( $a + b$ ) и каротиноидов, а также отсутствие визуально наблюдаемых нарушений в росте и развитии по сравнению с диким

типом. Напротив, трансгенные растения показывали отчетливое усиление ростовых процессов. Так, 12-недельные растения линий 1.1, 1.3, 1.7 и 2.1 превосходили нетрансформированные растения по длине побега (на  $27 \pm 19$ ,  $23 \pm 11$ ,  $56 \pm 16$  и  $84 \pm 18$  % соответственно) и по ширине листовой пластинки (на  $28 \pm 11$ ,  $19 \pm 7$ ,  $27 \pm 11$  и  $29 \pm 8$  % соответственно) (рис. 3). Полученные трансгенные растения характеризовались также более ранним цветением.

Т а б л и ц а 3. Содержание основных каротиноидов в растениях табака, трансформированных геном АЛК-синтетазы (линии 1.1–2.1)

Каротиноиды	Линия 1.1	Линия 1.3	Линия 1.7	Линия 2.1
Неоксантин	$124 \pm 9$	$104 \pm 10$	$103 \pm 21$	$134 \pm 12$
Виолоксантин	$77 \pm 5$	$108 \pm 9$	$78 \pm 9$	$127 \pm 10$
Антраксантин	$121 \pm 21$	$109 \pm 10$	$122 \pm 32$	$173 \pm 33$
Лютеин	$100 \pm 3$	$107 \pm 6$	$81 \pm 11$	$117 \pm 5$
$\beta$ -каротин	$97 \pm 4$	$106 \pm 7$	$92 \pm 14$	$122 \pm 5$

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в % по отношению к соответствующим показателям в растениях дикого типа.

Отсутствие увеличения содержания хлорофиллов у линий с повышенной способностью синтезировать АЛК ферментом, локализованным в митохондриях (линии 1.1, 1.3, 1.7), может указывать на то, что синтезируемая в митохондриях дополнительная АЛК не транспортировалась в хлоропласты. В то же время наибольшим содержанием фотосинтетических пигментов обладала линия 2.1, полученная с использованием плазмиды pALASC, не имеющей в своем составе последовательности, кодирующей лидерный пептид для транспортировки белка в митохондрии или хлоропласты. Как известно, основным источником сукцинил-КоА (субстрата АЛК-синтетазы) является цикл трикарбоновых кислот в митохондриях [15]. В литературе имеются данные о пере-

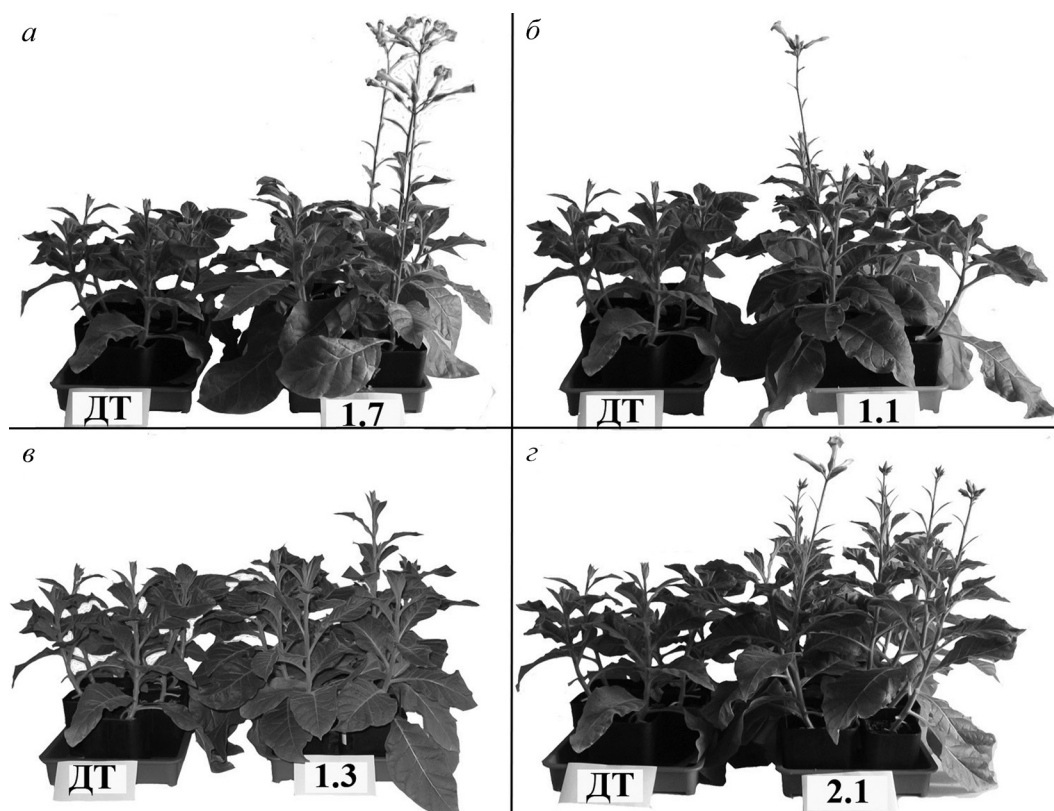


Рис. 3. Внешний вид 12-недельных трансформированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) поколения P1: а – растения дикого типа (ДТ) и трансгенные растения линии 1.7; б – ДТ и растения линии 1.1; в – ДТ и растения линии 1.3; г – ДТ и растения линии 2.1

носе промежуточных продуктов цикла Кребса, таких как малат, аспартат, сукцинат, из митохондрий в цитоплазму клеток животных организмов [26]. Для растительных объектов такие данные отсутствуют. Мы не исключаем возможности синтеза АЛК с участием дрожжевой АЛК-синтетазы в цитозоле, ее последующей транспортировки в хлоропласты и участия в синтезе хлорофиллов, как это наблюдается при обработке растений экзогенной АЛК [2]. Транспортировка цитозольной АЛК-синтетазы в хлоропласты представляется маловероятной, поскольку в этом процессе должен участвовать высокоспецифичный для хлоропласта лидерный белок-переносчик, кодирующая последовательность для которого отсутствует в плазмиде pALASC.

**Заключение.** Таким образом, создано три линии трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 (линии 1.1, 1.3 и 1.7), экспрессирующих рекомбинантный ген *Saccharomyces cerevisiae* АЛК-синтетазы, который содержит последовательность сигнального пептида для транспорта синтезируемого в цитоплазме фермента в митохондрии, и одна линия трансформантов (линия 2.1), экспрессирующих ген АЛК-синтетазы, синтезируемой и локализованной в цитоплазме. Все полученные трансгенные растения обладали повышенной АЛК-синтезирующей способностью и характеризовались улучшенными ростовыми показателями. В растениях линии 2.1 отмечено также повышенное по сравнению с растениями дикого типа содержание фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов.

Созданные трансгенные растения могут быть использованы в качестве модели для исследования роли умеренно повышенного уровня эндогенной АЛК в усилении фотосинтетической активности хлоропластов, а также в формировании стрессоустойчивых растений, что будет способствовать созданию биотехнологически улучшенных сортов сельскохозяйственных культур.

### Список использованной литературы

1. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапиролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 413 с.
2. Яронская, Е. Б. Экологически безопасные регуляторы роста растений на основе 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, Н. Г. Аверина, М. А. Кисель // Тр. БГУ. – 2012. – Т. 7. – Ч. 1. – С. 127–134.
3. Effects of 5-Aminolevulinic Acid on Growth and Inhibition of Various Plant Species / K. Yongin [et al.] // Kor. J. Crop. Sci. – 2003. – Vol. 48. – P. 127–133.
4. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth / Y. Hotta [et al.] // Biosci. Biotech. Biochem. – 1997. – Vol. 61. – P. 2025–2028.
5. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops / Y. Hotta [et al.] // Plant Growth Regul. – 1997. – Vol. 22. – P. 109–114.
6. Enhancement of growth and fruit maturity in 2-year-old grapevines cv. Delaware by 5-aminolevulinic acid / K. Watanabe [et al.] // Plant Growth Regul. – 2006. – Vol. 49. – P. 35–42.
7. Promotive effect of 5-Amino Levulinic on growth, yield and gas exchange capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under drought regimes / S. A. Al-Khateeb [et al.] // J. King Saund Univ. Agric. Sci. – 2006. – Vol. 18. – P. 103–111.
8. Wang, L. J. Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions / L. J. Wang, W. B. Jiang, B. J. Huang // Physiol. Plant. – 2004. – Vol. 121, N 2. – P. 258–264.
9. Яронская, Е. Б. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, И. В. Вершиловская, Н. Г. Аверина // Вес. НАН Беларусі. – Сер. біял. навук. – 2004. – Vol. 3. – P. 70–73.
10. Beyzaei, Z. Exogenous 5-aminolevulinic acid increases the expression of *Nar1* gene and nitrate reductase protein accumulation in barley seedling / Z. Beyzaei, R. A. Sherbakov, N. G. Averina // J. of Med. & Biol. Sci. – 2014. – Vol. 1. – P. 102–106.
11. Youssef, T. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer / T. Youssef, M. A. Awad // J. Plant Growth Regul. – 2008. – Vol. 27. – P. 1–9.
12. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. / K. Watanabe [et al.] // Plant Growth Regul. – 2000. – Vol. 32. – P. 99–103.
13. Hotta, Y. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid / Y. Hotta, T. Tanaka, B. Luo // J. of Pesticide Sci. – 1998. – Vol. 23. – Iss. 1. – P. 29–33.
14. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*) / E. Nishihara [et al.] // J. Plant Physiol. – 2003. – Vol. 160. – P. 1085–1091.
15. Zavgorodnyaya, A. Yeast 5-aminolevulinic synthase provides additional chlorophyll precursor in transgenic tobacco / A. Zavgorodnyaya, B. Papenbrock, J. Grimm // The Plant J. – 1997. – Vol. 12, N 1. – P. 169–178.
16. Defence response produced during photodynamic damage in transgenic rice overexpressing 5-aminolevulinic acid synthase / S. Jung [et al.] // Photosynthetica. – 2008. – Vol. 46, N 1. – P. 3–9.



17. Keng, T. Amino-terminal fragment of delta-aminolevulinic synthase can direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix / T. Keng, E. Alani, L. Guarente // *Mol. Cell. Biol.* – 1986. – Vol. 6, N 2. – P. 355–364.
18. The nucleotide sequence of the HEM1 gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinic synthase in *Saccharomyces cerevisiae* / D. Urban-Grimal [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – Vol. 156. – P. 511–519.
19. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants / R. A. Jefferson [et al.] // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, N 13. – P. 3901–3907.
20. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures/ T. Murashige [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
21. *Plant Genetic transformation and Gene expression: a Laboratory Manual* / J. Draper [et al.]. – Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1988. – P. 69–160.
22. Light-induced delta-aminolevulinic acid in dark-grown barley seedlings / G. W. Miller [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 1979. – Vol. 20. – P. 131–143.
23. Mauzerall, D. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in Urine / D. Mauzerall, S. J. Granick // *Biol. Chem.* – 1956. – Vol. 219. – P. 435–446.
24. William, A. C. High performance liquid chromatography of tobacco and tobacco smoke components / A. C. William // *Recent advances in tobacco science.* – 1986. – Vol. 12. – P. 143–185.
25. Fatica-Gaignier, M. Adenine nucleotide levels and photopigment synthesis in a growing photosynthetic bacterium / M. Fatica-Gaignier, J. D. Clement-Metral, M. D. Kamen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. – Vol. 226, N 1. – P. 135–143.
26. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем; пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.

*Поступила в редакцию 26.03.2015*