

УДК 581.1

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ ВИНОГРАДА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА**

**Е.Б. Рукавицова<sup>1</sup>, В.В. Алексеева<sup>1</sup>, С.В. Тарлачков<sup>1</sup>, Н.С. Захарченко<sup>1</sup>, А.К. Сурин<sup>2</sup>, Е.Ю. Горбунова<sup>1</sup>,  
В.Н. Азев<sup>1</sup>, Я.И. Бурьянов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, Пуццино, Россия

<sup>2</sup> Институт белка РАН, Пуццино, Россия

Растения являются удобной, безопасной и экономически выгодной альтернативой для продукции различных метаболитов по сравнению с системами экспрессии на основе микроорганизмов, культур животных клеток или трансгенных животных. Одним из ценных метаболитов некоторых растений, в частности, винограда, является резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Синтез резвератрола в клетках растений происходит по фенилпропаноидному пути и регулируется ферментом стильбенсинтазой (STS). Резвератрол является антиоксидантом и обладает противоопухолевым, антибактериальным и противовирусным действием, а также благотворно влияет на сердечно-сосудистую, нервную систему человека и обладает гепатопротекторными свойствами. Кроме того, резвератрол является фитоалексином и растения с экспрессией гена стильбенсинтазы могут обладать повышенной устойчивостью к фитопатогенам. Для создания коммерческих растительных продуцентов резвератрола необходимо увеличение уровня экспрессии стильбенсинтазы за счет использования сильных вирусных промоторов. Цель данной работы – анализ физиологических и биохимических особенностей трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с повышенным синтезом резвератрола.

Нами получены и проанализированы несколько линий трансгенных растений табака с геном стильбенсинтазы винограда STS (GenBank AB046375.1) под контролем сильного конститутивного двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS. Наличие генов STS и неомицинфосфотрансферазы *nptII* в геноме полученных растений было доказано методом ПЦР. Растения восьми трансгенных линий, в ДНК которых выявлялись фрагменты ДНК, соответствующие по размерам гену STS и внутреннему фрагменту гена *nptII*, были выбраны для дальнейших анализов.

Первоначально экспрессия гена STS в трансгенных растениях была показана методом полуколичественной ОТ-ПЦР. В РНК исследованных линий обнаружены продукты транскрипции фрагмента гена STS величиной 150 п.н., тогда как у контрольного растения соответствующие транскрипты отсутствовали. В линии Л17 экспрессию гена STS не наблюдали. В результате отобрано семь независимых линий табака с геном STS и маркерным геном *nptII*.

Экспрессия гена STS в этих линиях трансгенных растений проанализирована с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. По данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии гена STS был минимален в линии Л24 и максимален в линии Л10, при этом разница в экспрессии между линиями с минимальным и максимальным уровнем отличалась более, чем в 100 раз.

Поскольку ген стильбенсинтазы отвечает за синтез резвератрола в растениях, нами проведены эксперименты по определению количества этого метаболита в листьях трансгенных растений. Выполнен хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов листьев табака линии Л10 с наибольшим уровнем экспрессии гена STS. Показано, что синтез резвератрола в трансгенных растениях составил до 150–170 мкг/г сырой биомассы. В полученных другими исследователями трансгенных растениях синтез резвератрола составлял от 0,1 до 650 мкг/г сырой биомассы, что сравнимо с количеством этого метаболита в кожуре ягод винограда, либо в листьях винограда после воздействия стресса [1].

Растения всех трансгенных линий с геном STS были высажены в закрытый грунт для получения гомозиготных линий и их дальнейшего анализа. Отобраны три гомозиготные линии для растений Л10 и две гомозиготные линии – для Л23.

Проведено изучение влияния встроенного гена на репродуктивные свойства растений и морфологию цветков. Повышенная экспрессия гена STS приводила к уменьшению пигментации венчиков цветков трансгенных растений. Цветки растений табака линии Л10 с наибольшей экспрессией гена STS имели почти белую окраску, хотя иногда в процессе созревания цветка приобретали слабо-розовую пигментацию. Содержание суммы антоцианов в венчиках цветков этих трансгенных растений снизилось до 48,7 % от количества антоцианов в венчиках контрольных цветков. При этом цветки трансгенной линии Л7 с «молчащим» геном STS не отличались от контрольных. Этот факт может быть результатом конкуренции за субстрат между ферментами стильбенсинтазой и халконсинтазой [2]. Общее количество флавоноидов также уменьшилось на 26–29 % в цветках линий табака с наибольшей экспрессией гена STS (Л10 и Л23) по сравнению с цветками нетрансформированных растений. В то же время не обнаружено снижение количества флавоноидов в листьях этих линий. Это крайне важное наблюдение, учитывая участие флавоноидов в регуляции развития растений, защите от ультрафиолетового излучения и передаче сигналов между растениями и микроорганизмами. Показанное нами уменьшение содержания флавоноидов в органах цветков могло повлиять на репродуктивные свойства трансгенных растений табака. Так, нами обнаружено негативное влияние конститутивной экспрессии гена STS на развитие пыльцы трансгенных растений (лишь 30 % пыльцевых зерен растений линии Л10 прорастали на среде с сахарозой) и в дальнейшем на семенную продуктивность этих растений табака. У трансгенных растений и их потомства уменьшился средний вес семенных коробочек. Для растений табака поколения Т2 вес коробочек составлял 70,2–88,8 % от контроля в Л23 и 47,4–52,6 % в Л10. Таким образом, снижение уровня флавоноидов может влиять как на окраску цветков трансгенных растений, так и на образование пыльцы и семенную продуктивность.

Проведены опыты по определению устойчивости полученных растений к грибным фитопатогенам *Fusarium oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea* и к бактериальному фитопатогену *Erwinia carotovora*. Показана частичная устойчивость растений с наибольшим синтезом резвератрола к *B. cinerea* и *E. carotovora*.

Следует отметить, что ген STS, обеспечивающий трансгенные растения устойчивостью против фитопатогенных микроорганизмов, может быть перспективен для использования в биотехнологии растений. Полученные векторные конструкции с геном стильбенсинтазы можно в дальнейшем использовать для исследования эффекта этого гена в различных трансформированных растениях.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16–08–00511.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Delaunois B., Cordelier S., Conreux A., Clement C., Jeandet P. Molecular engineering of resveratrol in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2009. V. 7. P. 2–12.
2. Fischer R., Budde I., Hain R. Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco // *Plant J.* 1997. V. 11. P. 489–498.