

## ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ *IN VITRO* КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ГЕНАМИ ДЕСАТУРАЗ

Е.В. Цыпурская, Т.Н. Николаева, Н.В. Загоскина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, [elena-pr22@mail.ru](mailto:elena-pr22@mail.ru)

**Аннотация.** Проведено изучение состава фенольных соединений в *in vitro* культивируемых растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и полученных из них линий, трансформированных генами  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы (*desA*) и  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*), методом тонкослойной хроматографии и денситометрии. Представлены данные о составе и содержании основных компонентов фенольного комплекса, извлекаемых из листьев растений 96%-ным этанолом.

**Ключевые слова:** картофель, *in vitro*, десатураза, фенольные соединения

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1418-1422

Фенольные соединения относятся к одним из наиболее распространенных вторичных метаболитов растений, значительно отличающихся по структуре и химическим свойствам [Запрометов, 1993]. Их функциональная роль разнообразна, включая и участие в защите клеток от стрессовых воздействий [Cheynier et al., 2013]. Фенольные соединения являются компонентами антиоксидантной системы [Меньщикова, 2006; Lin et al., 2006]. Они могут инактивировать активные формы кислорода, тем самым замедляя окисление липидов клеточных мембран [Kondo, Kawashima, 2000; Stefanowska et al., 2002].

Физическое состояние биологических мембран зависит от функционирования десатураз – ферментов, отвечающих за образование двойных (C=C) связей в цепях жирных кислот [Urchurch, 2008; Лось, 2014]. Известно, что десатуразы обладают высокой специфичностью по отношению к длине углеводородной цепи и к месту возникновения двойной связи. Первая двойная связь всегда формируется после 9-го атома углерода (ответственна  $\Delta 9$ -ацил-липидная десатураза, *desC*), а вторая двойная связь – в положении  $\Delta 12$  (ответственна  $\Delta 12$ -ацил-липидная десатураза, *desA*). Отметим, что ненасыщенные жирные кислоты являются важными компонентами клеточных мембранных структур, и модификация их уровня имеет значение для текучести мембран, интеграции в мембранах рецепторов, образования вторичных переносчиков и клеточных сигнальных механизмов, которые необходимы для функционирования клеток как в нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов [Лось, 2005].

В настоящее время трансгенные растения широко используются как модели для фундаментальных исследований и решения прикладных задач, в том числе по созданию устойчивых форм растений [Вячеславова и др., 2012]. Это касается и введения генов десатураз, которые приводят к изменениям физических свойств мембран у трансформантов растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот), что отражается на их физиолого-биохимических характеристиках, в том числе и биосинтезе фенольных соединений [Загоскина и др., 2014].

Целью нашего исследования являлось изучение основных компонентов фенольного комплекса контрольных и трансгенных растений картофеля, несущих ген  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*) или ген  $\Delta 12$ - ацил-липидной десатуразы (*desA*).

**Объект и методы исследования.** Объектом исследования являлись культивируемые в условиях *in vitro* растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., раннеспелый сорт Скороплодный), а также полученные из них трансгенные линии, несущие гены десатураз. Для получения трансгенных линий использовали конструкции, несущие ген *desA* из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, или ген *desC* из цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, под контролем сильного конститутивного промотора 35SCaMV. Последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу. Экспрессия целевого гена была подтверждена результатами полимеразной цепной реакции, а уровень экспрессии был оценен по активности лихеназы, входящей в состав гибридного белка [Герасименко и др., 2010].

Растения картофеля, культивируемые в условиях *in vitro*, размножали микрочеренкованием, используя агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 2% сахарозы. Их выращивали в пробирках в камере фитотрона ИФР РАН при +24 °С и 16 ч освещении (люминесцентные лампы белого света ЛБ-80, освещенность 100 моль квантов/м·с) в течение 5 недель. При проведении исследований использовали листья, взятые из средней части 45-дневных растений.

Фенольные соединения извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом (45 °С, 45 мин). Надосадочную фракцию отделяли центрифугированием (13000 об/мин, 10 мин) и использовали для проведения тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых слоем микрокристаллической целлюлозы («Ferak» или «Merck», Германия). В качестве растворителя использовали смесь: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5, верхняя фаза).

Предварительную идентификацию фенольных соединений проводили на ультрамикроскопе DESAGA UVIS («DESAGA», Голландия) по специфической ярко-голубой или синей флуоресценции в УФ-свете (длина волны 254 и 366 нм). Для дальнейшей идентификации использовали качественные реакции со специфическими реагентами: смесью 1%-ного водного раствора хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ) и 1%-ного водного раствора калия железосинеродистого ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) – на все классы фенольных соединений; 1%-ным этанольным раствором хлористого алюминия ( $\text{AlCl}_3$ ) с последующей идентификацией в УФ – свете (яркая желтая или желто-зеленая флуоресценция) – на флавоноиды, а также диазотированным п-нитроанилином с последующей обработкой 20% раствором карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) – на фенолкарбоновые кислоты [Запрометов, 1974].

Для более точной идентификации фенольных соединений хроматограммы сканировали на денситометре (Densitometer CD 50, Desaga, Heidelberg) при длинах волн 280 и 330 нм. Рассчитывали площади пиков каждого индивидуального соединения [Николаева и др., 2010].

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами были отмечены различия в биосинтезе фенольных соединений у контрольных и трансгенных растений картофеля, выращенных в условиях *in vitro* [Загоскина и др., 2014]. Однако это касалось лишь содержания различных их классов, но не индивидуальных соединений, что и явилось предметом нашего исследования.

Согласно данным тонкослойной хроматографии и денситометрического анализа, состав фенольных соединений, извлекаемых этанолом из листьев контрольных и трансформированных генами *desA* и *desC* растений картофеля, отличался (рисунок, таблица).

В составе фенольного комплекса контрольных растений присутствует 5 основных соединений фенольной природы, у линий с геном *desA* – 6, а у линий с геном *desC* – 7. Во всех вариантах отмечено образование веществ 1 и 2, наибольший уровень которых

отмечается у линии с геном *desA*. Эти соединения имеют низкие значения Rf и одно из них (1) относится к фенолкарбоновым кислотам (таблица). Вещества 3 и 6 обнаружены только в трансгенных линиях *desA* и *desC* и не характерны для контрольного варианта.

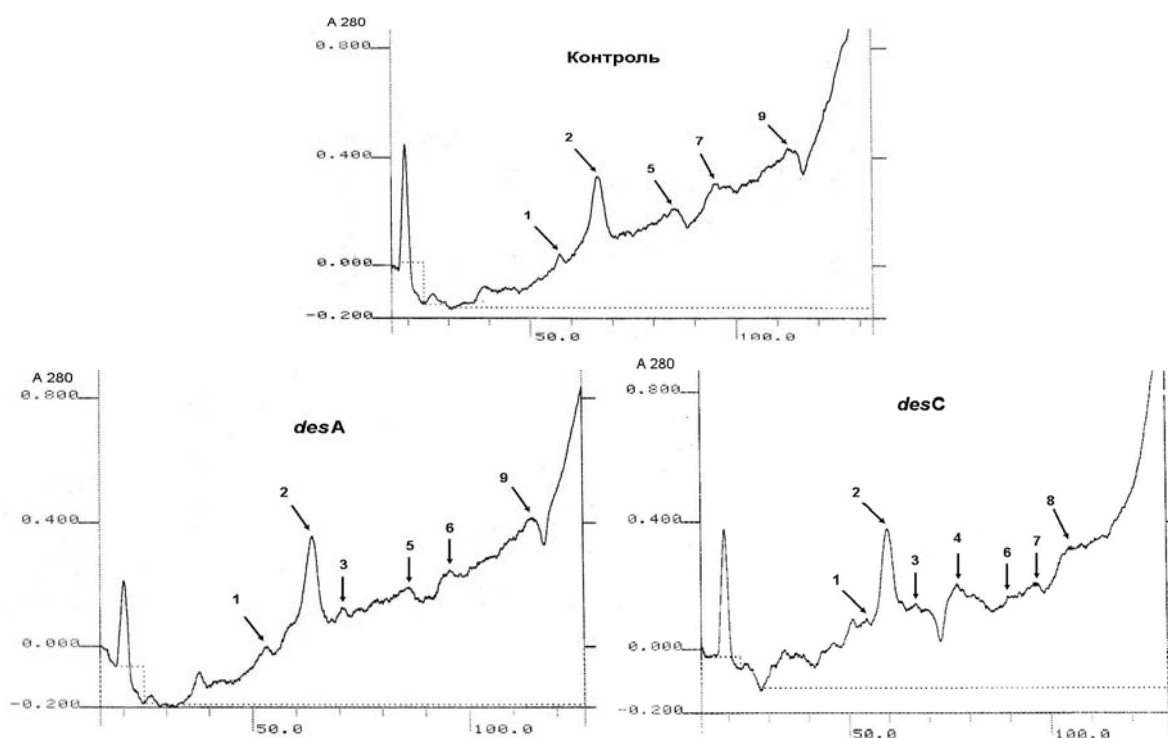


Рисунок. Денситограммы этанольных экстрактов листьев контрольных и трансгенных линий растений картофеля с генами *desA* и *desC*.

Таблица. Основные компоненты фенольного комплекса контрольных и трансгенных растений картофеля

N в-ва	Rf	Реакция на:			Содержание в-ва (усл. ед.×10 <sup>-2</sup> ) контроль/ <i>desA</i> / <i>desC</i>	Соединение
		ФС*	ФЛ**	ФКК***		
1	0,29	+	-	+	11,9/16,3/9,5	ФКК
2	0,35	+	-	-	45,1/52,4/31,0	ФС
3	0,41	+	-	-	0/11,8/13,0	ФС
4	0,47	+	-	-	0/0/18,2	ФС
5	0,54	+	+	-	6,5/ 11,1/0	ФЛ
6	0,58	+	+	-	0/28,7/20,3	ФЛ
7	0,62	+	+	-	22,1/0/22,1	РУТИН
8	0,70	+	-	-	0/0/34,3	ФС
9	0,77	+	-	-	11,3/12,2/0	ФС

\*ФС – фенольные соединения; \*\*ФЛ – флавоноиды; \*\*\*ФКК – фенолкарбоновые кислоты

Следует также отметить, что для листьев растений картофеля, культивируемых в условиях *in vitro*, характерно образование рутина – одного из наиболее распространенных флавоноидных соединений [Запрометов, 1993]. При этом он был обнаружен в растениях контрольного варианта и трансгенной линии *desC* (в одинаковом количестве).

Исходя из полученных данных, можно заключить, что введение генов десатураз *desA* и *desC* в геном растений картофеля, приводит к изменениям в биосинтезе фенольных соединений, что проявляется на уровне содержания и состава отдельных их представителей.

#### Литература

Вячеславова А.О., Бердичевец И.Н., Тюрин А.А., Шимшилашвили Х.Р., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В. Экспрессия гетерологичных генов в растительных системах: новые возможности // Генетика. – 2012. – Т. 48, №. 11. – С. 1245–1245.

Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Шимшилашвили Х.Р., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14 (1). – С. 127–133.

Загоскина Н.В., Прядёхина Е.В., Лапшин П.В., Юрьева Н.О., Голденкова-Павлова И.В. Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля с различными уровнями экспрессии гена  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Известия РАН. Серия биологическая. – 2014. – № 2. – С. 142–149.

Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений: учебное пособие. – Высшая школа, 1974. – 211 с.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. – 272 с.

Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – М.: Научный мир, 2014.

Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник Российской академии наук. – 2005. – Т. 75, №. 4. – С. 338–345.

Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

Николаева Т.Н., Заварзина А.Г., Лапшин П.В., Заварзин А.А., Загоскина Н.В. Водорастворимые фенольные соединения *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. // Ин-т физиологии растений РАН. – М.: Научный мир, 2010. – 400 с.

Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – V. 72. – P. 1–20.

Kondo N., Kawashima M. Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes // J. Plant Research. – 2000. – V. 113, No. 3. – P. 311–317.

Lin C.M., Chen C.T., Lee H.H., Lin J.K. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids // Planta Med. – 2002. – V. 68. – P. 365–367.

Stefanowska M., Kuraś M., Kacperska A. Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) leaves // Annals of Botany. – 2002. – V. 90, No. 5. – P. 637–645.

Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress // Biotechnol. Lett. – 2008. – V. 30. – P. 967–977.

**CHANGES OF THE COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS  
IN THE TRANSFORMATION *IN VITRO* OF CULTIVATED POTATO PLANTS  
WITH THE GENES OF DESATURASES**

E.V. Tsyurskaya, T.N. Nikolaeva, N.V. Zagoskina

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *elena-pr22@mail.ru*

**Abstract.** The composition of phenolic compounds the control and potato plants (*Solanum tuberosum* L., Skoroplodnyi cultivar) transformed with the  $\Delta 12$  acyl-lipid desaturase gene (*desA*) and the  $\Delta 9$  acyl-lipid desaturase gene (*desC*) were compared by thin-layer chromatography and densitometry. Data on the composition and content of the main components of the phenolic complex extracted from plant leaves with 96% ethanol are presented.

**Keywords:** *potato, in vitro, desaturase, phenolic compounds*