

УДК 575.827:604.6:582.683.2

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ СЕМЕЙСТВА КРЕСТОЦВЕТНЫХ КАК ПРОДУЦЕНТЫ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С ДЛИННОЙ УГЛЕРОДНОЙ ЦЕПЬЮ



Л. А. САХНО

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

E-mail: sakhno2007@ukr.net

Рассмотрены достижения и перспективы создания и использования масличных растений семейства крестоцветных (рапс *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., горчица сарептская *Brassica juncea* (L.) Czern., горчица абиссинская *Brassica carinata* A. Braun) для получения ненасыщенных жирных кислот с длиной (C_{18} – C_{24}) углеродной цепью диетического (стеарионовая, арахидоновая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, нервоновая), фармацевтического (γ -линоленовая, таксоловая, пиноленовая) и технического (эруковая, гондоиновая, докозодиеновая) назначения.

Ключевые слова: *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, мононенасыщенные жирные кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты.

В настоящее время известно свыше 800 природных жирных кислот [1], которые принято делить по степени ненасыщенности на три группы: насыщенные, моноеновые (мононенасыщенные) и полиеновые (полиненасыщенные).

Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в рацион питания, обладают профилактическими и терапевтическими свойствами при многих заболеваниях человека инфекционной и неинфекционной природы: сердечно-сосудистых [2], ревматоидном артрите [3], бронхо-легочной патологии [4–6], диабете [7], вирусных инфекциях [8–11], психических расстройствах [12].

Незаменимые жирные кислоты — линолевая ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$, ω -6) и α -линоленовая ($C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$, ω -3) — являются важными составляющими всех клеточных мембран. Изменяя проницаемость последних, эти кислоты определяют и влияют на поведение мембраносвязанных энзимов и рецепторов. Линолевая и α -линоленовая кислоты не синтезируются в организме млекопитающих, они поступают с пищей. Эти кислоты — предшественники целого ряда соединений, играющих определяющую роль в поддержа-

нии функционирования организма: простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, липоксинов, резолвинов, протектинов [1, 13]. Высказываются предложения о рациональности назначения беременным и кормящим женщинам, новорожденным полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с целью уменьшения риска как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний [14]. γ -Линоленовая кислота ($C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$, ω -6) оказывает существенное влияние на уменьшение риска развития атеросклероза [15] и снижает клинические проявления хронических заболеваний, таких как ревматоидный артрит [16] и атопическая экзема [17]. Сумма количеств эйкозапентаеновой (ЭПК, $C_{20:5}^{\Delta 5,8,11,14,17}$, ω -3) и докозагексаеновой (ДГК, $C_{22:6}^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$, ω -3) кислот в мембранах эритроцитов отображает содержание их в миокарде, поэтому этот показатель, названный ω -3-индексом, было предложено рассматривать как новый маркер, характеризующий риск коронарной сердечной недостаточности [18]. Выявлено, что введение в рацион ЭПК снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний на 19% [19].

Основными источниками поступления в организм человека полиненасыщенных жирных кислот с длинной (свыше C_{18}) углеродной цепью — арахидоновой ($20:4^{A5,8,11,14}$), эйкозапентаеновой ($20:5^{A5,8,11,14,17}$) и докозагексаеновой ($22:6^{A4,7,10,13,16,19}$) — являются морепродукты — рыба и водоросли. Однако рыбные ресурсы и, соответственно, количество жирных кислот с оптимальным (5:1) соотношением ω -6 и ω -3 жирных кислот, которые могут быть использованы в пищу, ограничены [20, 21]. Кроме того, долгоживущие виды накапливают значительное количество ртути из-за загрязнения вод Мирового океана. Получение полиненасыщенных жирных кислот из водорослей дорогостоящее.

В связи с этим актуальным становится создание высших растений, с помощью масел которых можно восполнить дефицит полиненасыщенных высших жирных кислот, поскольку цветковые растения в большинстве своем не могут их синтезировать из-за отсутствия соответствующих ферментов. Получить растения, осуществляющие синтез таких кислот, можно только биотехнологическими методами. Решению этой проблемы посвящены работы ряда лабораторий [22–26].

Кроме диетического и фармацевтического, ненасыщенные жирные кислоты с длинной углеродной цепью имеют также важное значение для промышленного получения косметологических, лакокрасочных, смазочных и других материалов. Задача повышения их накопления в масличных растениях может быть решена с помощью биотехнологии.

Жирнокислотный состав масел основных масличных культур семейства крестоцветных

В семействе крестоцветных насчитывается до 380 родов и около 3 200 видов. К ним относятся такие масличные растения, как рапс (*Brassica napus* var. *napus*), горчица сарептская (*Brassica juncea*), горчица черная (*Brassica nigra*), горчица абиссинская (*Brassica carinata*), горчица белая (*Sinapis alba*), рыжик (*Camelina sativa*), индау (*Eruca sativa*), катран абиссинский (*Crambe abyssinica*), лекерелла Фендлера (*Lesquerella fendleri*) [27].

Одной из важнейших масличных культур среди растений семейства является масличный рапс *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., который выращивается в 61 стране и занимает сейчас третье место в мировом производстве растительных масел (табл. 1) [28].

Посевные площади рапса в мире в 2008 г. составили 30 308 662 га, трансгенный рапс выращивался в четырех странах — США, Канаде, Австралии, Чили (рис. 1, 2) [29].



Рис. 1. Регенерация рапса из листовых эксплантов на среде с фосфинотрицином



Рис. 2. Цветущее растение рапса (биотехнологическая линия с геном *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения в ядерном геноме)

Общая площадь посевов этой культуры (кроме малых сельхозпредприятий) в 2006 г. в Украине составляла 401,2 тыс. га [30], в 2007 г. она возросла почти вдвое — до 799 тыс. га [31], а в 2008 г. равнялась уже 1 379 600 га [31].

Таблица 1. Мировое производство некоторых видов растительных масел, 2008 г. [28]

№ п/п	Вид масла	Количество, тыс. т
1	Пальмовое	38 936 925
2	Соевое	37 524 824
3	Рапсовое	18 171 518
4	Подсолнечное	11 027 327
5	Хлопковое	4 988 201
6	Оливковое	2 886 019
7	Кукурузное	2 217 006
8	Льняное	642 974

Горчица (*Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Sinapis alba*) в 2008 г. выращивалась в 28 странах на общей площади 678 793 га, было собрано 507 806 т семян [31], из них в Украине за этот период с 54800 га — 38 800 т семян.

Следует отметить, что потребление рапсового масла в пищевых целях в нашей стране невелико, хотя соотношение ω -6/ ω -3 жирных кислот в нем составляет 2:1 или 7:1 у высокоолеиновых сортов (оптимально 5:1 [20]), в оливковом масле — 9:1, а в преимущественно потребляемом в Украине подсолнечном масле — 70:1 (табл. 2).

Изменения в составе жирных кислот масел растений семейства *Brassicaceae*. Жирные кислоты как диетические и фармацевтические вещества

Шагом вперед в решении проблемы дефицита полиненасыщенных жирных кислот

с длинной углеродной цепью пищевого назначения можно считать получение растений рапса, накапливающих до 16–23% стеариноновой ($18:4^{\Delta 6,9,12,15}$) кислоты [34], которая, хотя и в меньшей степени, чем эйкозапентаеновая, увеличивает ω -3-индекс и уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний [35, 36].

Трансформированные растения рапса экспрессировали гетерологичные $\Delta 6$ - и $\Delta 12$ -десатуразы из гриба *Mortierella alpina* и введенную собственную $\Delta 15$ -десатуразу, причем введение трех генов в одной кассете вело к накоплению стеариноновой кислоты до 16% от общего количества жирных кислот, в то время как при раздельной трансформации (кДНК десатуразами гриба и $\Delta 15$ -десатуразой рапса) с последующей гибридизацией трансформированных растений этот показатель возрастал на 7% [35]. Общее содержание ω -3 жирных кислот в семенах рапса, полученных в первой серии экспериментов, составило более 60%, во второй — достигало 55%. Количество ω -6 жирных кислот оставалось стабильным — 22%.

Перспективным может быть введение кДНК, изолированной из микроводоросли *Mantoniella squamata*, определяющей координированный, исключительно ацил-СоА-зависимый путь, который обеспечивает трансэтерификацию ациллипидов из пула молекул ацил-СоА в процессе биосинтеза полиненасыщенных жирных кислот. Соответствующие эксперименты были проведены на дрожжах, получены также семена арабидопсиса, в которых обнаружены как ожидаемые

Таблица 2. Содержание жирных кислот в растительных маслах, % [32, 33]

Жирные кислоты (упрощенная формула)	Яровая сурепица	Рапс эруковый	Канола	Канола высокоолеиновая	Оливки	Пальма	Соя	Кукуруза	Подсолнечник
Насыщенные									
Пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0)	16	19	7	7	15	51	15	13	12
Мононенасыщенные (ω -9)									
Олеиновая (18:1)	32	22	61	70	75	39	23	29	16
Эруковая (22:1)	23	40	следы	следы	следы	—	—	—	—
Полиненасыщенные (ω -3 и ω -6)									
Линолевая (18:2), ω -6	19	12	21	20	9	10	54	57	71
α -Линоленовая (18:3), ω -3	10	7	11	3	1	—	8	1	1

эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты, так и ряд новых кислот, что подтверждает функциональность биосинтетического пути для полиненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью [37]. Проблема заключается в пока еще достаточно низком уровне накопления требуемых жирных кислот. Преодолению ее, по мнению авторов, может способствовать поиск более эффективных десатураз и элонгаз [25, 38–40]. Так, идентификация гена $\Delta 4$ -десатуразы (*Fad4*) гриба *Thraustochytrium* sp. и его экспрессия в тканях (листья, стебли, корни) горчицы сарептской *Brassica juncea* с использованием экзогенного субстрата (погружение растительных тканей в раствор докозапентаената натрия) послужило доказательством как существования самого пути образования докозагексаеновой кислоты через образование $\Delta 4$ двойной связи в молекуле докозапентаеновой, так и подтверждением возможности образования этой кислоты в растениях горчицы [41].

Кроме того, одним из определяющих моментов успеха является выбор объекта трансформации. При работе с высоколинолевой (45,2%) линией 1424 горчицы сарептской *Brassica juncea* удалось достичь накопления арахидоновой кислоты до 25% от общего количества жирных кислот в семенах трансформированных растений за счет экспрессии 5 чужеродных генов ($\Delta 6$ -десатуразы гриба *Pythium irregulare*, $\Delta 5$ -десатуразы гриба *Thraustochytrium* sp. 26185, $\Delta 12$ -десатуразы календулы *Calendula officinalis*, $\Delta 6$ -элонгазы мха *Physcomitrella patens* и $\Delta 6$ -элонгазы *Thraustochytrium* sp. 26185). При использовании для трансформации той же исходной линии горчицы для введения 9 (дополнительно к перечисленным выше ω -3-десатуразы *Pythium irregulare*, $\Delta 4$ -десатуразы *Thraustochytrium* sp. 26185, лизофосфатидилацилтрансферазы *Thraustochytrium* sp. 26185 и элонгазы форели радужной *Oncorhynchus mykiss*) генов в одной кассете получили растения, накапливающие до 15% эйкозапентаеновой кислоты [42]. Уровень линолевой кислоты у трансформантов снижался почти в 3 раза.

Традиционными источниками γ -линоленовой кислоты — ценного фармацевтического сырья — являются такие растения, как бурачник (*Borago officinalis* L., *Boraginaceae*) и ослинник (*Oenothera biennis* L., *Onagraceae*). Они накапливают 17–28% и 7–10% этой кислоты соответственно. Это делает получение масел из них значительно более дорогостоящим, чем из других мас-

личных растений. С помощью биотехнологических подходов — одновременной экспрессии генов $\Delta 6$ - и $\Delta 12$ -десатураз из гриба *Mortierella alpina* — стало возможным создание трансформированных растений рапса, накапливающих до 43% γ -линоленовой кислоты [43]. Дальнейшие исследования показали, что масло из семян рапса, продуцирующих высокое количество γ -линоленовой кислоты, всасывается и транспортируется в лимфу крыс таким же образом, как и масло из семян бурачника [44].

В семенах горчицы сарептской *Brassica juncea*, полученных в результате генетической трансформации, аккумулировалось до 40% γ -линоленовой кислоты благодаря экспрессии гена $\Delta 6$ -десатуразы из гриба *Pythium irregulare* [45].

Введение в геном горчицы сарептской от трех до девяти чужеродных генов (каждого под контролем напинного промотора) в одной конструкции приводило к накоплению в среднем до 27% γ -линоленовой кислоты в составе триацилглицеридов семян, причем максимальный эффект (29,4%) давало введение четырех генов ($\Delta 6$ -десатуразы гриба *Pythium irregulare*, $\Delta 5$ -десатуразы гриба *Thraustochytrium* sp. 26185, $\Delta 12$ -десатуразы календулы *Calendula officinalis*, $\Delta 6$ -элонгазы мха *Physcomitrella patens*) [42]. Следует отметить, что наряду с γ -линоленовой синтезировались арахидоновая (17%) и эйкозапентаеновая (1,7%) кислоты. Экспрессия введенных генов не влияла на морфологию растений и всхожесть семян.

Нервоновая кислота ($C_{24:1}^{\Delta 15}$) имеет диетическое значение, подобное арахидоновой и эйкозапентаеновой кислотам. Интерес к ней возрос, когда было высказано предположение, что потребление нервоновой кислоты может поддерживать нормальное образование и функционирование миелина в головном мозге и нервной ткани [46]. Эта мононенасыщенная жирная кислота с длинной углеродной цепью обнаружена в семенах растений, принадлежащих к разным семействам, например таких, как лунник *Lunaria annua* (*Brassicaceae*), конопля посевная *Cannabis sativa* (*Cannabaceae*), клен усеченный *Acer truncatum* (*Aceraceae*), настурция прекрасная *Tropaeolum speciosum* (*Tropaeolaceae*). В семенах *Lunaria annua* накапливается до 44% эруковой ($C_{22:1}^{\Delta 13}$) и 20% нервоновой кислот [47]. Лунник выращивали ранее на незначительных площадях в промышленных целях, масло использовали как сырье для производства смазочных материалов [48]. Однако культивирование

этого растения как источника нервоновой кислоты невыгодно из-за нестабильной урожайности, невысокой масличности (30%), двухлетнего периода развития, проблем с осыпаемостью семян и трудностями сбора урожая [47].

В семенах растений горчицы абиссинской *Brassica carinata*, линии С90-1163, трансформированной с помощью конструкции, несущей ген *3-кето-ацил-СоА-синтазы* (*KCS*, элонгазы жирных кислот, ЕС 2.3.1.86) из *Lunaria annua*, наблюдали увеличение накопления нервоновой кислоты до 30%. Это в 10 раз превышало содержание данной кислоты в семенах нетрансформированной исходной линии (2,8%) и на 10% — в семенах лунника [49]. Уровень накопления эруковой кислоты в трансгенных семенах горчицы абиссинской снизился на 10% по сравнению с исходной линией и был существенно ниже (20%) по сравнению с таковым в семенах *Lunaria annua*. Этот показатель весьма важен с точки зрения использования растительного масла в пищевых целях, поскольку высокое содержание $C_{22:1}$ негативно влияет на сердечно-сосудистую систему животных [50]. Таким образом, с использованием биотехнологических методов удалось создать растения *Brassica carinata* с высоким (30%) содержанием в семенах нервоновой кислоты, однако применение их масла в фармацевтических и диетических целях тормозится из-за превышающего оптимальный (5%) уровень накопления эруковой кислоты [51]. Перспективным, с точки зрения авторов, для увеличения количества нервоновой кислоты и, соответственно, уменьшения уровня эруковой, может быть коэкспрессия гена *KCS* из *Lunaria annua* с подобным геном из катрана абиссинского (*Crambe abyssinica*) [52]. Кроме того, для увеличения общего количества жирных кислот в полученных линиях горчицы абиссинской и повышения таким способом содержания нервоновой кислоты можно было бы использовать введение некоторых генов дрожжей: *SLC1-1* [53], диацилглицеролацилтрансферазы *DGAT* [54] или глицерофосфатдегидрогеназы *GPDI* [55].

Интеграция в геном рапса кДНК $\Delta 5$ -десатуразы из гриба *Mortierella alpina* позволила обеспечить синтез таксоловой ($18:2^{\Delta 5,9}$) (из олеиновой) и пиноленовой ($18:3^{\Delta 5,9,12}$) (из линоленовой) кислот благодаря энзиматической активности гетерологичного протеина [56]. Накопление таксоловой кислоты достигало 6% от общего количества жирных кислот. Пиноленовая кислота детектирова-

лась в следовых количествах, поскольку для трансформации была взята линия *B. napus* с низким содержанием субстрата для введенной десатуразы — линоленовой кислоты.

Пуниковая кислота ($18:3^{\Delta 9,11,13}$) является одним из конъюгированных изомеров линоленовой кислоты. Она обнаружена в семенах граната и трихозанта *Tricosanthes kirilovii*, влияет на снижение веса животных за счет уменьшения накопления жиров. Введением кДНК, полученной из семян *Tricosanthes kirilovii* и кодирующей конъюгазу, которая превращает линолевую кислоту в пуниковую, удалось достичь накопления желаемой кислоты в масле семян рапса, хотя и в незначительном количестве (~2,5% от общего содержания масла) [57]. Однако и этого количества оказалось достаточно для ожидаемого терапевтического эффекта: даже содержание 0,25% (по весу) пуниковой кислоты в диете мышей в течение 4 нед приводило к снижению их массы за счет изменения липидного метаболизма (возрастания карнитин-пальмитилтрансферазной активности). Сравнение влияния равных количеств масел из граната и генетически модифицированного рапса показало, что последнее эффективнее снижает массу тела мышей.

Таким образом, пластичность растений семейства крестоцветных и генно-инженерные манипуляции по введению чужеродных генов позволили к настоящему времени получить ряд трансгенных масличных растений — рапс, горчицу сарептскую, горчицу абиссинскую, которые являются перспективными как продуценты моно- и полиненасыщенных жирных кислот, обладающих ценными диетическими и фармацевтическими свойствами.

Ненасыщенные жирные кислоты — сырьевая база для промышленного производства

Ценным промышленным сырьем является эруковая кислота ($C_{22:1}^{\Delta 13}$), используемая для производства стали, предназначенной для химической промышленности, для создания новых полимеров, а также в качестве возобновляемого источника биотоплива [58–59].

До 60-х годов XX в. традиционным считался рапс с содержанием эруковой кислоты 45% от общего количества жирных кислот в масле семян [32]. Рапсовое масло имело тогда ограниченное пищевое применение из-за характерной горечи, придаваемой глюкозинолатами, отрицательного воздействия

эруковой кислоты на сердечно-сосудистую систему и вредного влияния глюкозинолатов на щитовидную железу и печень. С обнаружением мутантов, у которых был нарушен синтез эруковой кислоты [60], и вовлечении их в селекционный процесс удалось получить сорта, объединяемые теперь под названием «канола», — в их семенах около 2% эруковой кислоты и менее 30 мкМ глюкозинолатов/г сухого остатка [33]. Доминирующей жирной кислотой в масле таких сортов рапса является олеиновая (табл. 2).

Высокие уровни содержания эруковой кислоты характерны и для семян других представителей семейства капустных, таких как лунник *Lunaria annua* (до 44%) [47], горчица абиссинская *Brassica carinata* (до 30%) [49], катран абиссинский *Crambe abyssinica* (до 58–66%) [61, 62], индау *Eruca sativa* (до 50–55%) [63], горчица азиатская *B. tournefortii* (44–50%) [64], горчица черная *Brassica nigra* (до 27–38%) [64], горчица сарептская *B. juncea* (до 45%) [64], горчица белая *Sinapis alba* (до 55%) [65], а также для семян настурции большой *Tropaeolum majus* (до 80%), семейства настурциевых [66].

Для сокращения затрат при получении эруковой кислоты для промышленного использования желательнее добиться максимально возможного накопления ее в семенах. При использовании мутантов [67] и традиционных скрещиваний [68–70] удалось поднять уровень накопления эруковой кислоты в рапсовом масле с 45% до 50–55%. В результате генно-инженерных манипуляций на основе высокоэруковой (52%) линии BGRV2 [71] получены растения с 63%-м накоплением этой кислоты — трансгенная линия 361.2В, характеризующаяся сверхэкспрессией гена элонгазы жирных кислот (*fae1*) и экспрессией гена *Ld-lpaat* *Limnanthes douglasii* [72]. Гибридизация мутантной линии 6575-1 HELP, которая накапливала эруковую кислоту в количестве 50% и синтезировала незначительное количество полиненасыщенных жирных кислот [73] с трансгенной линией 361.2В дала возможность создать растения рапса, накапливающие до 72% эруковой кислоты [72], что является на сегодня самым большим достижением. До этого высказывались предположения, что максимальное количество эруковой кислоты, которое может накапливаться в семенах рапса, ограничивается 66% [74].

В экспериментах с табаком было показано, что трансгенные растения, в ядро которых был интегрирован ген *cup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения,

опережают контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития [75]. Предполагают, что этот ген может оказывать плейотропное влияние, изменяя в том числе качественные и количественные характеристики масла семян трансгенных растений. В нашей лаборатории получены растения рапса, несущие в ядерном геноме ген *cup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка (рис. 1, 2) [76]. По предварительным данным происходит снижение содержания линоленовой кислоты, что может привести к увеличению сроков хранения семян и продуктов их переработки без ухудшения качества.

Введение гена Δ5-десатуразы из пенника (*Limnanthes douglasii*, *L. alba*) в геном горчицы абиссинской привело к накоплению нехарактерных для этого вида гондоиновой (C20:1^{Δ5}) и докозадиеновой (C22:2^{Δ5,Δ13}) кислот, которые являются важным сырьем для производства смазочных материалов [77]. Гондоиновой кислоты синтезировалось не более 1%, тогда как количество докозадиеновой (около 11%) соответствовало уменьшению уровня эруковой кислоты (C22:1^{Δ13}) — с 42% до почти 32%. Это свидетельствует о субстратспецифичности введенной десатуразы и возможности увеличения количества требуемых кислот за счет подбора оптимального вида или линии для трансформации и дальнейшего совершенствования генно-инженерных подходов.

К настоящему времени имеются существенные достижения в области создания биотехнологических растений, в том числе принадлежащих к семейству крестоцветных. Поскольку такие важные виды, как рапс, горчица сарептская, горчица абиссинская, выращиванием которых занимаются во многих странах мира [28], являются, кроме всего прочего, и масличными культурами, основное внимание уделялось изменению жирнокислотного состава масла семян.

Путем экспрессии чужеродных десатураз удалось добиться высокого уровня накопления ценного фармацевтического продукта — γ-линоленовой кислоты — в семенах рапса [43] и горчицы сарептской [45], для которых синтез этого вещества не характерен: 43% и 40% от общего количества жирных кислот, соответственно.

Идентификация генов десатураз и элонгаз из микроводорослей, грибов, мхов, рыб, у которых происходит синтез и накопление полиненасыщенных высших жирных кислот, и введение их в геном масличных крес-

тоцветных позволило уже сейчас создать растения рапса, накапливающие в семенах до 23% стеарионовой кислоты [35], а также растения горчицы сарептской, аккумулирующие до 25% арахидоновой, около 29% γ -линоленовой и 15% эйкозапентаеновой кислот [42]. Перечисленные кислоты, синтезированные в растениях, могут служить существенным дополнением к тем количествам ω -3 жирных кислот, поступающим в рацион питания человека из морепродуктов, объем которых в настоящее время сокращается из-за чрезмерной эксплуатации ресурсов Мирового океана [21]. В семенах трансгенных растений горчицы абиссинской накапливалось до 30% нервоновой кислоты, что превышает уровень содержания этой кислоты в растении-доноре гена элонгазы и в 10 раз — в исходной линии [47]. Полиненасыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты рекомендуется употреблять для профилактики и лечения многих заболеваний человека инфекционной и неинфекционной природы [2–17, 19–20].

Нельзя не отметить вклад биотехнологических разработок в решение проблем созда-

ния масличных растений сем. *Brassicaceae* с высоким содержанием в семенах мононенасыщенной эруковой кислоты, используемой для производства стали, предназначенной для химической промышленности, для создания новых полимеров, в качестве возобновляемого источника биотоплива. Максимальным на сегодня достижением в этой области является создание растений рапса, которые накапливали до 72% эруковой кислоты [72] благодаря скрещиванию трансгенной линии 361.2B (63%) и мутантной линии 6575-1 HELP (50%).

Перспективы создания высокопродуктивных трансгенных масличных растений семейства крестоцветных, способных накапливать значительные количества моно- и полиненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью, определяются поиском оптимального исходного растительного материала и эффективных генов десатураз и элонгаз, необходимых для соответствующих метаболических реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васьковский В. Е. Липиды // Сорос. образ. журн. — 1997. — № 3. — С. 32–37.
2. Psota T. L., Gebauer S. K., Kris-Etherton P. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk // Am. J. Cardiol. — 2006. — V. 98 (suppl.). — P. 3–18.
3. James M. J., Cleland L. G. Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis // Semin Arthritis Rheum. — 1997. — V. 27. — P. 85–97.
4. Гончар К. Ефективність лікування хворих на туберкульоз легень з використанням Епадолу // Ліки. — 2003. — № 11. — С. 71–73.
5. Olanoff L. S., Reizens H. D. Effects of dokosahexanoic acid on pulmonary capillary leak and tromboxans // J. Surg. Res. — 2001. — V. 53. — P. 151–159.
6. Коржов В. И., Алфёров А. Н., Коржов М. В. Метаболизм митохондрий и микросом печени при экспериментальной бронхо-лёгочной патологии и применении омега-3 полиненасыщенных жирных кислот // www.ifp.kiev.ua [FTP архив] URL ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2004/zip/korzhov2004-3.zip.
7. Suresh Y., Das U. N. Differential effect of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on alloxan-induced diabetes mellitus // Prostaglandins Leukot. Essen. Fatty Acids. — 2000. — V. 63. — P. 351–362.
8. Kohn A., Gitelman J., Inbar M. Unsaturated free fatty acids inactivate animal enveloped viruses // Arch. Virol. — 1980. — V. 66. — P. 301–307.
9. Karadia S. B., Chisari F. V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2005. — V. 102. — P. 2561–2566.
10. Huang H., Chen Y. Ye. J. Inhibition of hepatitis C virus replication by peroxidation of arachidonate and restoration by vitamin E // Ibid. — 2007. — V. 104. — P. 18666–18670.
11. Villamor E., Koulinska I. N., Furtado J. et al. Long-chain n-6 polyunsaturated fatty acids in breast milk decrease the risk of HIV transmission through breastfeeding // Am. J. Clin. Nutr. — 2007. — V. 86. — P. 682–689.
12. Kotani S., Sakaguchi E., Warashina S. et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction // Neurosci. Res. — 2006. — V. 56. — P. 159–164.
13. Das U. N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology, and pathology // Biotech. J. — 2006. — V. 1. — P. 420–439.
14. Das U. N. Can essential fatty acids reduce the burden of disease(s)? // Lipid. Health. Dis. — 2008. — V. 7. — P. 9–13.
15. Fan Y. Y., Ramos K. S., Chapkin R. S. Modulation of atherogenesis by dietary gamma-linolenic

- acid // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2000. — V. 469. — P. 485–491.
16. *Barham J. B., Edens M. B., Fonteh A. N. et al.* Addition of eicosapentaenoic acid to γ -linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans // *J. Nutr.* — 2000. — V. 130. — P. 1925–1931.
17. *Henz B. M., Jablonska S., van de Kerkhof P. C. et al.* Double-blind, multicentre analysis of the efficacy of borage oil in patients with atopic eczema // *Br. J. Dermatol.* — 1999. — V. 140. — P. 685–688.
18. *Harris W. S.* Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor // *Pharmacol. Res.* — 2007. — V. 55. — P. 217–223.
19. *Harris W. S., Lemke S. L., Hansen S. N. et al.* Stearidonic acid-enriched soybean oil increased the omega-3 index, an emerging cardiovascular risk marker // *Lipids.* — 2008. — V. 43. — P. 805–811.
20. *Trautwein E. A.* ω -3 fatty acids — physiological and thechnical aspects for their use in food // *Eur. J. Lipid Sci. Thechnol.* — 2001. — V. 103. — P. 45–55.
21. *Garcia S. M., de Leiva Moreno I., Grainger R.* Global trends in the state of marine fisheries resources 1974–2004. — <http://www.fao.org/docrep/009/y5852e/Y5852E02.htm#ch1.1>.
22. *Kinney A. J., Cahoon E. B., Hitz W. D.* Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants // *Biochem. Soc. Trans.* — 2002. — V. 30, N 6. — P. 1099–1103.
23. *Abbadì A., Domergue F., Bauer J. et al.* Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation // *Plant Cell.* — 2004. — V. 16. — P. 2734–2748.
24. *Qi B., Fraser T., Mugford S. et al.* Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants // *Nat. Biotechnol.* — 2004. — V. 22. — P. 739–745.
25. *Damude H. W., Zhang H., Farrall L. et al.* Identification of bifunctional $\Delta 12/\omega 3$ fatty acid desaturases for improving the ratio of $\omega 3$ to $\omega 6$ fatty acids in microbes and plants // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 2006. — V. 103, N 25. — P. 9446–9451.
26. *Truksa M., Vrinten P., Qiu X.* Metabolic engineering of plants for polyunsaturated fatty acid production // *Mol. Breeding.* — 2009. — V. 23, N 1. — P. 1–11.
27. Цветковые растения. Жизнь растений / Под ред. Тахтаджяна А. Л. — М.: Просвещение — 1981. — Т. 5, Ч. 2. — С. 67.
28. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx# ancor>
29. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>: ISAAA Brief-39-2008: Executive summary.
30. <http://www.proagro.com.ua/art/41357.html>: Госкомстат Украины: сортовые посевы сельскохозяйственных культур под урожаем 2006 г. — 02.10.2006.
31. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx# ancor>
32. Гольцов А. А., Ковальчук А. М., Абрамов В. Ф., Милащенко Н. З. Рапс, сурепица — М.: Колос, 1987. — 192 с.
33. http://www.canola-council.org/oil_tech.html
34. *Knutzon D.* Methods and compositions for synthesis of long chain poly-unsaturated fatty in plants // United States Patent 6051754. — 2000.
35. *Ursin V. M.* Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids // *J. Nutrition.* — 2003. — V. 133. — P. 4271–4274.
36. *James M. J., Ursin V. M., Clerand L. G.* Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2003. — V. 77. — P. 1140–1145.
37. *Hoffmann M., Wagner M., Abbadì A. et al.* Metabolic engineering of $\omega 3$ -VLCPUFA production by an exclusively acyl-CoA-dependent pathway // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283, N 33. — P. 22352–22362.
38. *Drexler H., Spiekermann P., Meyer A. et al.* Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results // *J. Plant Physiol.* — 2003. — V. 160. — P. 779–802.
39. *Kumon Y., Kamisaka Y., Tomita N. et al.* Isolation and characterization of a $\Delta 5$ -desaturase from *Oblongichytrium* sp. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2008. — V. 72, N 8. — P. 2224–2227.
40. *Niu Y., Kong J., Fu L. et al.* Identification of a novel C20-elongase gene from the marine microalgae *Pavlova viridis* and its expression in *Escherichia coli* // *Mar. Biotechnol.* — 2009. — V. 11, N 1. — P. 17–23.
41. *Qiu X., Hong H., MacKenzie S. L.* Identification of a $\Delta 4$ fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea* // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276, N 34. — P. 31561–31566.
42. *Wu G., Truksa M., Datla N. et al.* Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants // *Nat. Biotechnol.* — 2005. — V. 23, N 8. — P. 1013–1018.
43. *Liu J.-W., Huang Y.-S., DeMichele S. J. et al.* Characterization of oil exhibiting high level γ -linolenic acid from a genetically transformed canola strain // *JAOCs.* — 2001. — V. 78, N 5. — P. 489–493.

44. Tso P., Ding K., DeMichele S. et al. Intestinal absorption and lymphatic transport of high γ -linolenic acid canola oil in lymph fistula Sprague-Dawley rats // J. Nutr. — 2002. — P. 218–221.
45. Hong H., Dalta N., Reed D. W. et al. High-level production of γ -linolenic acid in *Brassica juncea* using a $\Delta 6$ desaturase from *Pythium irregulare* // Plant Physiol. — 2002. — V. 129. — P. 354–362.
46. Sargent J. R., Coupland K., Wilson R. Nervonic acid and demyelinating disease // Med. Hypoth. — 1994. — V. 42. — P. 237–242.
47. Mastebroek H. D., Marvin H. J. P. Breeding prospects of *Lunaria annua* L. // Ind. Crops Prod. — 2000. — V. 11, N. 2–3. — P. 139–143.
48. Meier zu Beerentrup H., Robbelen G. Screening for European production of oilseeds with unusual fatty acids // Angew Bot. — 1987. — V. 61. — P. 287–303.
49. Guo Y., Mietskiewska E., Francis T. et al. Increase in nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. 3-ketoacyl-CoA synthase (KCS) gene // Plant Mol. Biol. — 2009. — V. 69. — P. 565–575.
50. Erucic acid in food: a toxicological review and risk assessment. Technical report series No.21. Food standart Australia New Zeland. June 2003: <http://www.foodstandards.gov.au>.
51. Taylor D. C., Guo Y., Katavic V. et al. New seed oils for improved human and animal health and as industrial feedstocks: genetic manipulation of the *Brassicaceae* to produce oils enriched in nervonic acid // Modification of seed composition to promote health and nutrition (Krishman H.B., ed.): American Society of Agronomy. — 2009. — P. 219–233.
52. Mietskiewska E., Brost J. M., Giblin E. M. et al. Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE1) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet // Plant Biotechnol. J. — 2007. — V. 5. — P. 636–645.
53. Zou J.-T., Katavic V., Giblin E. M. et al. Modification of seed oil content and acyl composition in *Brassicaceae* by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene // Plant Cell. — 1997. — V. 9. — P. 909–923.
54. Jako C., Kumar A., Wei Y. et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a diacylglycerol acyl-transferase enhances seed oil content and seed weight // Plant Physiol. — 2001. — V. 126. — P. 861–874.
55. Vigeolas H., Waldek P., Zank T. et al. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by overexpression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter // Plant Biotechnol. J. — 2007. — V. 5, N 3. — P. 431–441.
56. Knutson D. S., Thurmond J. V., Huang Y.-S. et al. Identification of $\Delta 5$ -desaturase from *Mortierella alpine* by heterologous expression in bakers' yeast and canola // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273, N 45. — P. 29360–29366.
57. Koba K., Imamura J., Akashoshi A. et al. Genetically modified rapeseed oil containing cis-9,trans-11,cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice // J. Agric. Food Chem. — 2007. — V. 55, N 9. — P. 3741–3748.
58. Scarth R., Tang J. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches // Crop. Sci. — 2006. — V. 46. — P. 1225–1236.
59. Низова Г. К., Дубовская А. Г. Биохимическое изучение ярового и озимого рапса из коллекции ВИР им. Н. И. Вавилова // Аграрная Россия. — 2006. — № 6. — С. 37–40.
60. Stefansson B. R., Hougen F. W., Downey R. K. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid // Can. J. Plant. Sci. — 1961. — V. 41. — P. 218–219.
61. Lazzeri L., Leoni O., Conte L. S. et al. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products // Ind. Crops Prod. — 1994. — V. 3. — P. 103–112.
62. Wang Y. P., Tang J. S., C. Q. Chu C. Q. et al. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses // Ibid. — 2000. — V. 12, N 1. — P. 47–52.
63. Lazzeri L., Errani M., Leoni O. et al. *Eruca sativa* spp. *oleifera*: a new non-food crop // Ibid. — 2004. — V. 20. — P. 67–73.
64. Barthet V. J. (n-7) and (n-9) cis-monounsaturated fatty acid contents of 12 *Brassica* species // Phytochemistry. — 2008. — V. 69. — P. 411–417.
65. Zohara Y., Schafferman D., Elber Y. et al. Evaluation of *Sinapis alba*, native to Israel, as a rich source of erucic acid in seed oil // Ind. Crops Prod. — 1994. — V. 2, N 2. — P. 137–142.
66. Litchfield C. *Tropaeolum speciosum* seed fat: A rich source of cis-15-tetracosenoic and cis-17-hexacosenoic acids // Lipids. — 1970. — V. 5, N 1. — P. 144–146.
67. Scarth R., McVetty P. B. E., Rimmer S. A. et al. Hero summer rape // Can. J. Plant Sci. — 1991. — V. 71. — P. 865–866.
68. McVetty P. B. E., Rimmer S. A., Scarth R. Castor high erucic, acid low glucosinolate summer rape // Ibid. — 1998. — V. 78. — P. 305–306.
69. McVetty P. B. E., Scarth R., Rimmer S. A. MileniUM01 summer rape // Ibid. — 1999. — V. 79. — P. 251–252.

70. Luhs W., Friedt W. Breeding high-erucic acid rapeseed by means of *Brassica napus* resynthesis // Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. (GCIRC), Cambridge, UK. — 1995. — P. 449–451.
71. Wilmer J. A., Wallington E. J., Slabas A. R. Very high erucic acid rape: a dream or reality // Proc. 11th Int. Rapeseed Cong. (GCIRC), Cambridge, UK. — 2003. — P. 583–585.
72. Nath U. K., Wilmer J. A., Wallington E. J. et al. Increasing erucic acid content through combination of endogenous low polyunsaturated fatty acids alleles with *Ld-LPAAT+ Bn-fae1* transgenes in rapeseed (*Brassica napus* L.) // Theor. Appl. Genet. — 2009. — V. 118. — P. 765–773.
73. Sasongko N. D., Mollers C. Toward increasing erucic acid content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the combination with genes for high oleic acid // JAOCs. — 2005. — V. 82. — P. 445–449.
74. Schroder-Pontoppidan M., Skarzhinskaya M., Dixelius C. et al. Very long chain and hydroxylated fatty acids in offspring of somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* // Theor. Appl. Genet. — 1999. — V. 99, N 1–2. — P. 108–114.
75. Спивак С. Г., Бердичевец И. Н., Кармель Н. А. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // Фактори експериментальної еволюції організмів: 36. наук. праць, за ред. В. А. Кунаха — К.: Логос. — 2006. — Т. 4. — С. 639–644.
76. Сахно Л. А., Моргун Б. В., Кищенко Е. М., Кучук Н. В. Наследование введенных генов *bar* и *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения в T₁ поколении трансформированных линий табака и рапса // Там само. — 2009. — Т. 7. — С. 250–255.
77. Jadhav A., Marillia E.-F., Babic V. et al. Production of 22:2^{Δ5,Δ13} and 20:1^{Δ5} in *Brassica carinata* and soybean breeding lines via introduction of *Limnanthes* genes // Molec. Breed. — 2005. — V. 15. — P. 157–167.

ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ РОДИНИ ХРЕСТОЦВІТИХ ЯК ПРОДУЦЕНТИ НЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ З ДОВГИМ ВУГЛЕЦЕВИМ ЛАНЦЮГОМ

Л. О. Сахно

Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ

E-mail: sakhno2007@ukr.net

Розглянуто досягнення та перспективи створення й використання олійних рослин родини хрестоцвітих (ріпак *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., гірчиця сарептська *Brassica juncea* (L.) Czern., гірчиця абіссинська *Brassica carinata* A. Braun) для отримання ненасичених жирних кислот з довгим (C₁₈–C₂₄) вуглецевим ланцюгом дієтичного (стеаридонова, арахідонова, ейкозапентаєнова, докозагексаєнова, нервонова), фармацевтичного (γ-ліноленова, таксолова, піноленова) і технічного (ерукова, гондоїнова, докозадієнова) призначення.

Ключові слова: *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, мононенасичені жирні кислоти, поліненасичені жирні кислоти.

TRANSGENE CRUCIFEROUS PLANTS AS PRODUCENTS OF LONG CHAIN UNSATURATED FATTY ACIDS

L. A. Sakhno

Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: sakhno2007@ukr.net

Achievements and prospects of creation and application of oilseed cruciferous plants (rapeseed *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., Indian mustard *Brassica juncea* (L.) Czern, Abyssinian mustard *Brassica carinata* A. Braun) for obtaining of unsaturated fatty acids with a long (C₁₈–C₂₄) carbon chain for dietary (stearidonic, arachidonic, eicosapentaenoic, docosahexaenoic, nervonic), pharmaceutical (γ-linolenic, taxoleic, pinolenic) and technical (erucic, gondoinic, dokozadienoic) purposes are discussed.

Key words: *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, monounsaturated fatty acid, polyunsaturated fatty acids.