

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 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% стеариновой (18:4^{Δ6,9,12,15}) 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 Δ 6- и Δ 12-десатуразы из гриба *Mortierella alpina* и введенную собственную Δ 15-десатуразу, причем введение трех генов в одной кассете вело к накоплению стеариновой кислоты до 16% от общего количества жирных кислот, в то время как при раздельной трансформации (кДНК десатуразами гриба и Δ 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 арахиноновая 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 арахиноновой 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, продуцирующее 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 напинового 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 арахиноновая (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 арахиноновой 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^{Δ5,9}) (из олеиновой) и пиноленовой (18:3^{Δ5,9,12}) (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^{Δ9,11,13}) 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 вовлечением 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% стеариноновой 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 361.2В (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. Васюковский 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. Эффективність 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 hepatic 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 technical aspects for their use in food // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* — 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. *Abadi 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 посеы сельскохозяйственных культур под урожай 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., Abadi 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 (Krishnan 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. Barthelet 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. MilleniUM01 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., Бердичевець І. Н., Кармель Н. А. Трансгенні рослини тютюну, експресуючі ген *CYP11A1* цитохрому P450_{SCC} тваринного походження // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. 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* цитохрому P450_{SCC} животного происхождения в T₁ поколении трансформированных линий тютюна 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, gondoinoic, dokozadienoic) purposes are discussed.

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