

UDC 575.827:604.6:582.683.2

## Создание устойчивых к глифосату растений *Brassica napus* L., экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *Synechococcus vulcanus*

Л. А. Сахно<sup>1</sup>, И. М. Герасименко<sup>1</sup>, И. К. Комарницкий<sup>1</sup>,  
Ю. В. Шелудько<sup>1</sup>, И. В. Голденкова-Павлова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, Украина, 03680

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН  
Ул. Губкина, 3, Москва, Российская Федерация, 119991

sakhno@icbge.org.ua

**Цель.** Создание растений рапса, устойчивых к глифосату и экспрессирующих бифункциональный гибридный ген *desC::licBM3*, в котором последовательность десатуразы DesC цианобактерии *S. vulcanus* без сигнала транспорта в пластиды слита с последовательностью гена репортерного белка термостабильной лишенизы LicB *Clostridium thermocellum*. **Методы.** *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованная трансформация, ПЦР, качественное и количественное определение активности термостабильной лишенизы, генетический анализ. **Результаты.** Получены трансгенные растения рапса, несущие два целевых гена: енолируватишкимафосфатсинтазы (*epsps*), обеспечивающего устойчивость растений к гербицидам на основе фосфонометилглицина, и гена *desC::licBM3*. Присутствие трансгенов в геноме растений доказано методом мультиплексной ПЦР. Экспрессия гена *epsps* показана на уровне транскрипции, в условиях *in vitro* и *in vivo* (теплица). Наличие продукта гена *licBM3* в составе гибридного белка позволило оценить экспрессию слитого с ним гена десатуразы. Прослежено наследование введенных генов и их экспрессия в первом поколении. **Выводы.** Получены линии трансгенных растений рапса, подтверждено присутствие трансгенов в геноме растений и доказана экспрессия целевых генов.

**Ключевые слова:** *Brassica napus*, *epsps*, *desC*, *licBM3*, лишениза.

**Введение.** В связи с меняющимися климатическими условиями немаловажной становится такая характеристика растений, как устойчивость к стрессовым факторам различного происхождения, в том числе к пониженным температурам и фитопатогенам.

Одним из механизмов адаптации растений к холоду является увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах, обеспечивающее необходимую текучесть мембран при пониженных температурах [1]. Важную роль в этом играют десатуразы жирных кислот, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях (C–C) в двой-

ную связь (C=C). Согласно имеющимся данным, у высших растений синтез Δ<sup>9</sup>-мононенасыщенных жирных кислот происходит в пластидах, а образование дополнительных двойных связей может осуществляться как в пластидах, так и в эндоплазматическом ретикулуме. Однако есть сообщения о клонировании генов, кодирующих Δ<sup>9</sup>-ацил-липидные десатуразы, предположительно функционирующие вне пластид [2].

С использованием биотехнологических подходов к настоящему времени получен ряд растений с повышенным количеством моно- и полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов. В результате агробактериальной трансформации (*Agrobacterium tumefaciens*) в геном табака

*Nicotiana tabacum* L. введен ген  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Anacystis nidulans*. Этот фермент катализирует образование *цис*-двойной связи в позиции  $\Delta 9$  как в 16-, так и в 18-углеродных насыщенных жирных кислотах. Вследствие этого у созданных растений значительно увеличивается количество ненасыщенных жирных кислот в большинстве мембранных липидов, что приводит к существенному повышению холодоустойчивости [2]. Подобные изменения холодоустойчивости наблюдали и у растений табака, полученных при прямой (с помощью полиэтиленгликоля) трансформации протопластов с использованием векторов, содержащих либо кДНК  $\Delta 9$ -десатуразы цианобактерии *A. nidulans*, либо кДНК десатуразы  $\Delta 9$  устойчивого к холоду картофеля *Solanum commersonii* [3]. Встраивание гетерологичных десатураз различного происхождения приводит к сравнимым результатам в повышении холодоустойчивости. Экспрессия  $\Delta 9$ -десатуразы цианобактерии *S. vulcanus* [4] и FAD7 десатуразы *Arabidopsis thaliana* L. [5] в растениях табака также позволяет трансформантам выдерживать значительные холодовые нагрузки. Растения картофеля *Solanum tuberosum* L. становятся более устойчивыми к пониженным температурам после введения гена десатуразы  $\Delta 12$  *Synechocystis* sp. PCC 6803 [6], а также гена  $\Delta 9$ -десатуразы дикого картофеля *S. commersonii* [7].

Данные по изучению воздействия стрессовых факторов на плоды авокадо показывают, что с повышением активности  $\Delta 9$ -десатуразы (AvFAD9) они становились более устойчивыми к поражению патогенным грибом *Colletotrichum gloeosporioides* [8].

Рапс является третьей в мире (после пальмы и сои, [faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor](http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor)) масличной культурой по количеству производимого масла. Селекция рапса направлена в первую очередь на повышение урожайности, масличности, улучшение качества масла. Этого можно добиться и за счет получения растений, устойчивых к фитопатогенным грибам и проявляющих повышенную невосприимчивость к холоду.

Целью данной работы было создание устойчивых к гербициду Roundup растений рапса, экспрессирующих десатуразу DesC цианобактерии *S. vulcanus* (без сигнала транспорта в пластиды) в соста-

ве бифункционального репортерного гена, для дальнейшего тестирования трансгенных линий на устойчивость к стрессовым факторам различного происхождения.

**Материалы и методы.** *Растительный материал.* Материалом для трансформации служили асептически выращиваемые растения ярового рапса сорта Обрий. Семена любезно предоставлены Н. В. Слисарчуком (Национальный научный центр «Институт земледелия УААН»).

Генетическую трансформацию проводили с использованием листовых эксплантов согласно методике, предложенной нами ранее [9]. Инфицирование осуществляли одновременно двумя векторами, каждый из которых клонировали в *A. tumefaciens*, штамм GV3101. Вектор *pBISN-desC::licBM3* содержит гены *desC* ( $\Delta 9$ ) цианобактерии *S. vulcanus* и *licBM3* термостабильной лихены *Clostridium thermocellum* [10], слитые в одной рамке считывания под контролем промотора 35S ВМЦК, и селективный ген неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) под контролем промотора *nos*. Вектор *pCB133* несет гены *epsps* (целевой) под контролем промотора 35S ВМЦК и *bar* (селективный) под контролем промотора *nos*. Регенеранты отбирали на средах с фосфинотрицином (PPT, 5 мг/л).

*ПЦР-анализ.* Тотальную ДНК выделяли из листовой ткани трансформированных растений согласно методике [11]. Для реакции использовали 40 нг ДНК растительного образца, а также соответствующие праймеры в концентрации 0,5 мкМ и трифосфаты – 500 мкМ, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы, реакционный буфер содержал 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl (pH 9, 25 °C), 0,1 %-й тритон X-100 и 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Ген *epsps* идентифицировали с использованием праймеров, амплифицирующих фрагмент длиной 498 п. н. [12]. Гены *desC* и *licBM3* в ходе мультиплексной ПЦР определяли с помощью праймеров, которые амплифицировали фрагменты длиной 949 и 642 п. н. соответственно [13]. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и 1 нг плазмидного вектора (положительный контроль) амплифицировали с теми же праймерами и при тех же условиях с применением амплификатора «Mastercycler personal» («Eppendorf», ФРГ). Параметры

реакции амплификации соответствовали [12, 13]. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1 %-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере.

*Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР* проводили согласно [14].

*Тестирование на устойчивость к глифосату.* Стерильный раствор N-фосфонометилглицина (2,5 мг/л) добавляли к безгормональной питательной среде MS [15] после автоклавирования для тестирования устойчивости в асептических условиях. Через три недели оценивали корнеобразование и общее состояние растений. В условиях закрытого грунта трехнедельные адаптированные растения опрыскивали гербицидом Ураган Форте 500 SL согласно рекомендациям производителя («Syngenta», Швейцария). Рабочий раствор содержал 2,5 мг/л глифосата. Действие препарата оценивали через 7 дней.

*Качественное определение активности термостабильной лихеназы* проводили по [13].

*Количественное определение активности термостабильной лихеназы* осуществляли по модифицированному методу [16], измеряя количество свободных восстанавливающих сахаров после реакции суммарных белковых экстрактов листовой ткани с лихенаном. Листья растирали в однократном объеме 100 мМ трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 0,1 М NaCl, 5 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA и 10 мМ меркаптоэтанол, и центрифугировали при 13000 g (4 °C) в течение 5 мин. К 20 мкл надосадочной жидкости добавляли 50 мкл 0,5 %-го водного раствора лихенана, доводили водой до 500 мкл и инкубировали при температуре 65–70 °C в течение 95 мин. Затем вносили 500 мкл ДНС-реагента (1 %-я динитросалициловая кислота и 0,05 %-й сульфит натрия в 1 %-м растворе гидроксида натрия), 165 мкл 40 %-го K-Na-виннокислого и выдерживали на водяной бане при температуре 95–100 °C в течение 10 мин. Охлаждали до температуры 4 °C, после чего выдерживали на протяжении 15–20 мин при комнатной температуре.

Оптическую плотность растворов измеряли при 510 нм на фотометре BioPhotometer («Eppendorf», v.1.35).

Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному для глюкозы. За единицу активности принимали активность фермента, образующего 1 мкмоль восста-

навливающих сахаров за 1 с. Удельную активность рассчитывали на количество белка.

*Определение суммарного растворимого белка* выполняли по методу Брэдфорд [17].

**Результаты и обсуждение.** В ходе работы получены три линии растений рапса на основе сорта Обрий, несущие селективные гены *nptII* и *bar* и целевые *epsps* и *desC::licBM3*, благодаря одновременному кокультивированию эксплантов рапса с двумя агробактериальными векторами (*pCB133* и *pBISN-desC::licBM3*).

В конструкции *pBISN-desC::licBM3* селективным был ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к канамицину. Известно, что при его использовании в работе с растениями семейства крестоцветных возникает ряд трудностей на этапе регенерации. Низкие дозы этого антибиотика провоцируют появление ложных трансформантов, которые при последующем культивировании погибают под селективным давлением. Высокие количества канамицина препятствуют самому процессу регенерации [18]. Как выход рекомендуют временное снятие селективного давления, что удлиняет процесс получения трансформантов. Цель экспериментов с трансгенными линиями, несущими два целевых гена, состояла в получении растений с геном *desC* в составе гибридного гена и одновременном избежании негативного влияния канамицина.

Ранее показано, что присутствие PPT увеличивает количество регенерантов рапса при прямой трансформации протопластов с использованием полиэтиленгликоля [19]. Селекция на средах с PPT успешно применена нами при получении трансгенных растений рапса с беспромоторным геном *bar* [9], с геном цитохрома животного происхождения [20], с геном интерферона *альфа 2b* человека [21]. Поэтому и в данных экспериментах мы использовали вектор, T-ДНК которого содержит ген *bar*, для отбора трансформированных растений на средах с PPT.

После регенерации в селективных условиях отобраны 17 линий рапса. Данные ПЦР-анализа показывают наличие введенных целевых генов (*epsps*, *desC::licBM3*) в ядерном геноме трех из них – Bn18a, Bn18b, Bn18c (рис. 1, а, в). Остальные линии характеризуются присутствием двух гетероло-

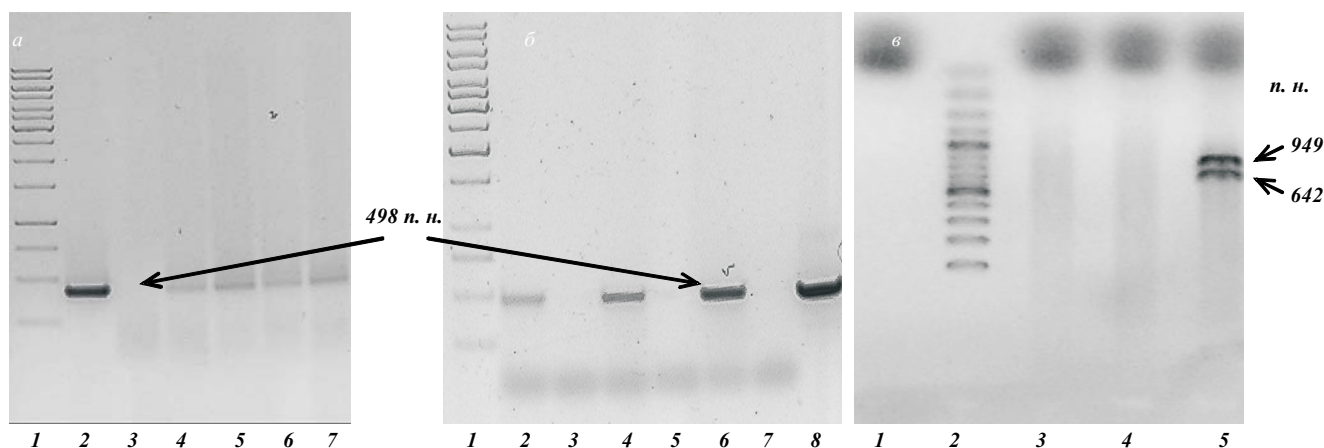


Рис. 1. Результаты ПЦР, подтверждающие присутствие последовательностей генов *epsps* (а: 1 – маркер м. м.; 2 – ДНК вектора *pCB133*; 3 – отрицательный контроль, ДНК исходного растения; 4–7 – ДНК линий Bn18a, Bn18b, Bn18c и 18/133/7), *desC* и *licBM3* (в: 1 – отрицательный контроль, без ДНК; 2 – маркер м. м. O'Gene-Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, «Fermentas», Литва; 3 – отрицательный контроль, ДНК исходного рапса сорта Обрий; 4 – отрицательный контроль, ДНК трансгенного рапса с геном *sup11A1*, линия Bn12/93/2; 5 – ДНК линии Bn18a с геном *desC::licBM3*) в трансформированных растениях рапса, а также ОТ-ПЦР трансгенных растений рапса (б: 1 – маркер м. м.; 8 – ДНК вектора *pCB133*, положительный контроль; 3, 5, 7 – продукты амплификации после синтеза первой цепи ДНК на матрице мРНК линий Bn18a, Bn18b и Bn18c без внесения ревертазы (отрицательный контроль); 2, 4, 6 – продукты амплификации после синтеза первой цепи ДНК с добавлением ревертазы линий Bn18a, Bn18b и Bn18c)

гичных генов из вектора *pCB133* – *epsps* и *bar*. Совместная интеграция двух Т-ДНК наблюдалась с частотой 17,6 %. В экспериментах с *A. thaliana* также отмечено одновременное встраивание двух и трех Т-ДНК (с частотой 30 и 9,5 % соответственно) при синхронной трансформации растений тремя векторами с разными генетическими конструкциями [22]. В работах с рапсом получены растения, несущие два целевых гена, доставленных разными векторами [23]. Эксперименты по введению различных генов в одной или нескольких конструкциях проводят для изучения и изменения метаболических путей, получения сложных белков или белковых комплексов, для исследования генетического контроля и регуляции [24]. В нашей работе при создании трансгенных растений с заданными целевыми генами такой подход применен для отбора с использованием наиболее подходящего для рапса селективного агента (фосфинотрицина).

Дальнейшие молекулярно-биологические, биохимические и генетические исследования проводили, анализируя линии растений, содержащие четыре введенных гена.

Экспрессия гена *epsps* в растениях рапса показана на уровне транскрипции (рис. 1, в). Кроме того, ее тестировали в условиях *in vitro* при росте на

среде с N-фосфометилглицином (2,5 мг/л) и при обработке растений гербицидом в теплице.

В асептических условиях растения всех трех линий нормально развивались, оставаясь зелеными и сохраняя способность к корнеобразованию без дополнительной стимуляции на селективной среде с глифосатом (рис. 2, а). Контрольные нетрансформированные растения желтели, не образовывали новых листьев и не формировали корней.

В условиях закрытого грунта трансформанты выдерживали опрыскивание рабочим раствором глифосата, в то время как контрольные растения увядали и не были способны к дальнейшему росту (рис. 2, б).

Лихеназный чашечный тест (рис. 3) был позитивным для всех трех линий, что свидетельствует об экспрессии гибридного гена *desC::licBM3*.

Первичные трансформанты (Bn18a, Bn18b) высаживали в теплицу, где они легко адаптировались, зацветали и давали жизнеспособные семена в результате самоопыления. Полученные семена проращивали в стерильных условиях на средах с РРТ (10 мг/л). Расщепления по признаку устойчивости к фосфинотрицину не наблюдали, что свидетельствует о встраивании более чем одной копии трансгена *bar*. Отобранные устойчивые к РРТ проростки





Рис. 2. Тестирование устойчивости к глифосату: *a* – двухнедельные растения исходного сорта Обрий (Bn18) и линии 18a в условиях *in vitro* на безгормональной агаризованной среде MS с N-фосфонометилглицином (2,5 мг/л); *б* – трехнедельные растения сорта Обрий (Bn18) и трансгенная линия 18a после обработки в теплице гербицидом Ураган Форте 500 SL

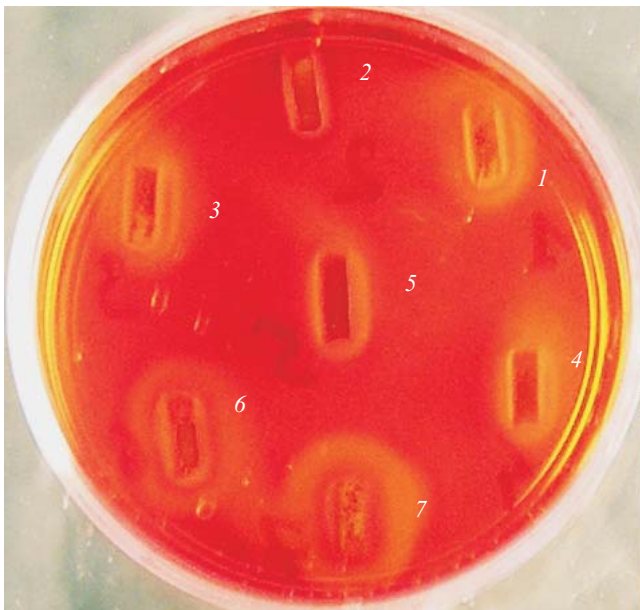


Рис. 3. Качественное определение активности термостабильной лихеназы в растениях рапса, содержащих ген *desC::licBM3*. В лунки с агаризованной средой, содержащей лихенан, вносили растительные экстракты линий: 1 – 18b; 2 – исходного сорта Обрий (Bn18); 3 – 18a; 4 – 18a/6; 5 – 18a/2; 6 – 18 b/25; 7 – линии табака, экспрессирующего ген *desC::licBM3* (положительный контроль)

пассировали на среду с канамицином. Резистентные к канамицину и PPT проростки тестировали на активность лихеназы (рис. 3).

Количественное определение активности фермента показало, что она отсутствует в контрольных

растениях, а среди трансгенных линий ее уровень варьирует (таблица). Наиболее высокой активностью лихеназы характеризовалась линия 18b. Линии 18a и 18b/25 имели сравнимые между собой, однако значительно более низкие, чем у линии 18b (меньше ~ на 40 %), показатели активности. Активность лихеназы для линии 18a/2 оказалась ниже уровня детекции. Первичные трансформанты (18b и 18a) имели более высокую активность лихеназы по сравнению с растениями первого поколения, полученными в результате самоопыления исходных линий (18b/25, 18a/2, 18a/6).

Различный уровень активности лихеназы в трансгенных линиях рапса свидетельствует об аналогичных отличиях в экспрессии целевого гена  $\Delta 9$ -десатуразы в составе гибридного гена. Уровень экспрессии гена может зависеть от места встраивания чужеродной ДНК и количества встроившихся копий трансгена. Подобные результаты, отражающие оценку экспрессии целевого гена на основании определения активности лихеназы в составе гибридного белка, получены методом зимограмм белковых экстрактов растений картофеля, трансформированных геном *cru3aM::licBM2* для обеспечения защиты от колорадского жука [25]. Различные уровни активности лихеназы в составе гибридного белка DesA-LicBM3 зафиксированы также в растениях картофеля, характеризующихся повышенным со-

Активность лихеназы в растениях рапса, несущих ген *licBM3* термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*

Линия	Активность лихеназы (чашечный тест)	Устойчивость к канамицину	Активность лихеназы, мкМ глюкозы·10 <sup>-6</sup> /(мкг белка)
18b	+	+	9,28
Bn18 (контроль)	-	-	Не детектируется
18a	+	+	5,52
18a/6	+/-	+	2,64
18a/2	+/-	+	Не детектируется
18b/25	+	+	5,02

держанием липидов в листьях и увеличенным количеством ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов [6].

**Выводы.** Таким образом, при одновременном введении четырех генов в двух независимых векторах удалось получить растения, в которых гетерологичные гены были функциональными. Экспрессия гена *epsps* показана на уровне транскрипции, в условиях *in vitro* и *in vivo* (теплица). Определение активности продукта гена *licBM3* в составе гибридного белка позволило оценить экспрессию слитого с ним гена десатуразы. Прослежено наследование введенных генов и их экспрессия в первом поколении.

Работа выполнена при поддержке гранта НАН Украины УкрИНТЭИ № 0110U006062, гранта ГФФД-РФФД F40.4/021 и гранта РФФИ № 11-04-90466-Укр\_ф\_а.

L. O. Sakhno<sup>1</sup>, I. M. Gerasymenko<sup>1</sup>, I. K. Komarnitskii<sup>1</sup>,  
Y. V. Sheludko<sup>1</sup>, I. V. Goldenkova-Pavlova<sup>2</sup>

Creation of glyphosate-resistant *Brassica napus* L. plants expressing DesC desaturase of cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine  
148, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>2</sup>N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS  
3, Gubkina Str., Moscow, Russian Federation, 119991

## Summary

**Aim.** Creation of glyphosate-resistant canola plants expressing bifunctional hybrid *desC::licBM3* gene. In the hybrid gene the sequence of DesC desaturase of cyanobacterium *S. vulcanus* without plastid targeting was fused with the sequence of thermostable lichenase reporter *LicBM3* gene. **Methods.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, PCR, quantitative and qualitative determination of lichenase activity, genetic analysis. **Results.** Transgenic canola plants, carrying

the *enolpyruvat shikimat phosphate syntase gene (epsps)*, conferring on plants resistance to phosphonomethyl glycine herbicides (Roundup), as well as the *desC::licBM3* gene, were selected. The presence of transgenes was confirmed by multiplex PCR. The *epsps* gene expression in canola was shown at the transcription level, during *in vitro* growth and after greenhouse herbicide treatment. Activity of the *licBM3* gene product as a part of hybrid protein allowed quantitative and qualitative estimation of the desaturase gene expression. Inheritance of heterologous genes and their expression in the first generation were investigated. **Conclusions.** Transgenic canola plants were obtained, the presence of transgenes in plant genome was proved and expression of the target genes was detected.

Keywords: *Brassica napus*, *desC*, *epsps*, *licBM3*, lichenase.

Л. О. Сахно, І. М. Герасименко, І. К. Комарницький,  
Ю. В. Шелудько, І. В. Голденкова-Павлова

Створення стійких до гліфосату рослин *Brassica napus* L., які експресують десатуразу DesC ціанобактерії *Synechococcus vulcanus*

## Резюме

**Мета.** Створення стійких до гербіциду Roundup рослин ріпаку, що експресують біфункціональний гібридний ген *desC::licBM3*, в якому послідовність десатурази DesC ціанобактерії *S. vulcanus* без сигналу транспорту в пластиди злита з послідовністю гена репортерного білка лихенази *LicBM3* *Clostridium thermocellum*. **Методи.** *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкована трансформація, ПЛР, якісне і кількісне визначення активності термостабильної лихенази, генетичний аналіз. **Результати.** Отримано трансгенні рослини ріпаку, які несуть два цільових гени: енолпіруватшкіматфосфатсинтази (*epsps*), що забезпечує стійкість рослин до гербіцидів на основі фосфонометилгліцину, і гена *desC::licBM3*. Присутність трансгенів у геномі рослин підтверджено методом мультиплексної ПЛР. Експресію гена *epsps* показано на рівні транскрипції, за умов *in vitro* та *in vivo* (теплиця). Наявність продукту гена *licBM3* у складі гібридного білка дозволила оцінити експресію злитого з ним гена десатурази. Простежено успадкування введених генів і їхня експресія в першому поколінні. **Висновки.** Отримано лінії трансгенних рослин ріпаку, підтверджено присутність трансгенів у геномі рослин і доведено експресію цільових генів.

Ключові слова: *Brassica napus*, *epsps*, *desC*, *licBM3*, лихеназа.

## REFERENCES

1. Los D. A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases// Biochim. Biophys. Acta.–1998.–**1394**, N 1.–P. 3–15.
2. Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M., Sekiguchi K., Murata N., Ohtani T., Toguri T. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase// Nat. Biotechnol.–1996.–**14**, N 8.–P. 1003–1006.
3. Craig W., Lenzi P., Scotti N., De Palma M., Saggese P., Carbone V., McGrath Curran N., Magee A. M., Medgyesy P., Kavanagh T. A., Dix P. J., Grillo S., Cardi T. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance// Transgenic Res.–2008.–**17**, N 5.–P. 769–782.
4. Orlova I. V., Serebriiskaya T. S., Popov V., Merkulova N., Nosov A. M., Trunova T. I., Tsydendambaev V. D., Los D. A. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid de-

- saturase enhances the chilling tolerance of plants // *Plant Cell Physiol.*—2003.—**44**, N 4.—P. 447–450.
5. Kodama H., Hamada T., Horiguchi C., Nishimura M., Iba K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco // *Plant Physiol.*—1994.—**105**, N 2.—P. 601–605.
  6. Maali A. R., Goldenkova-Pavlova I. V., Pchelkin V. P., Tsydendambaev V. D., Los D. A., Nosov A. M. Acyl-lipid  $\Delta$ 12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Biologija.*—2007.—**53**, N 2.—P. 4–7.
  7. De Palma M., Grillo S., Massarelli I., Costa A., Balogh G., Vigh L., Leone A. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants // *Mol. Breeding.*—2008.—**21**, N 1.—P. 15–26.
  8. Madi L., Wang X., Kobiler I., Lichter A., Prusky D. Stress on avocado fruits regulates  $\Delta^9$ -stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack // *Physiol. Mol. Plant Pathol.*—2003.—**62**, N 5.—P. 277–283.
  9. Sakhno L. A., Gocheva E. A., Komarnitskii I. K., Kuchuk N. V. Stable expression of the promoterless *bar* gene in transformed rapeseed plants // *Cytology and Genetics.*—2008.—**42**, N 1.—P. 21–28.
  10. Maali R., Schimschilashvili H. R., Pchelkin V. P., Tsydendambaev V. D., Nosov A. M., Los D. A., Goldenkova-Pavlova I. V. Comparative expression in *Escherichia coli* of the native and hybrid genes for acyl-lipid  $\Delta$ 9 desaturase // *Rus. J. Genet.*—2007.—**43**, N 2.—P. 121–126.
  11. Cheung W. Y., Hubert N., Landry B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // *PCR Methods Appl.*—1993.—**3**, N 1.—P. 69–70.
  12. Sakhno L. O., Komarnitskii I. K., Maistrov P. D., Kuchuk M. V. Creation of glyphosate resistant canola by synthetic *epsps* gene introduction // *Factors of experimental evolution of organisms.*—Kyiv: Logos, 2011.—P. 388–393.
  13. Gerasymenko I. M., Sakhno L. O., Golovach I. S., Kishchenko O. M., Sindarovska Y. R., Shimshilashvili H. R., Sheludko Y. V., Goldenkova-Pavlova I. V. Raise of plants possessing genes for acyl-lipid desaturases from the cyanobacteria // *VOGiS Herald.*—2010.—**14**, N 1.—P. 127–133.
  14. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.*—1987.—**163**, N 1.—P. 16–20.
  15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*—1962.—**15**, N 3.—P. 473–497.
  16. Wood T. M., Bhat K. M. Methods for measuring cellulase activities // *Methods Enzymol.*—1988.—**160**.—P. 87–112.
  17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–254.
  18. Radchuk V. V., Klocke E., Radchuk R. I., Blum Ya. B. Production of transgenic rape plants (*Brassica napus* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *Rus. J. Genet.*—2000.—**36**, N 7.—P. 932–941.
  19. Herve C., Rouan D., Guerche P., Montane M.-H., Yot P. Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein gene and a selectable marker gene // *Plant Science.*—1993.—**91**, N 2.—P. 181–193.
  20. Sakhno L. O., Morgun B. V., Kvasko O. Y., Kuchuk M. V. Transformed canola plants expressing mammalian *cyp11A1* gene of cytochrome P450scc // *Biotechnology (Ukrainian).*—2010.—**3**, N 5.—P. 74–82.
  21. Sakhno L. O., Kvasko O. Y., Olevinska Z. M., Spivak M. Y., Kuchuk M. V. Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human alpha 2b interferon gene // *Cytology and Genetics.*—2012.—**46**, N 6.—P. 342–346.
  22. Radchuk V. V., Van D. T., Klocke E. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous in planta transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains // *Plant Science.*—2005.—**168**, N 6.—P. 1515–1523.
  23. De Block M., Debrouwer D. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus // *Theor. Appl. Genet.*—1991.—**82**, N 3.—P. 257–263.
  24. Naqvi S., Farre G., Sanahuja G., Capell T., Zhu C., Christou P. When more is better: multigene engineering in plants // *Trends Plant Sci.*—2010.—**15**, N 1.—P. 48–56.
  25. Goldenkova-Pavlova I. V., Mirahorli N., Maali A. R., Isaenko E., Kartel N. A. Experimental models for creation of transgenic plants resistant to stressors // *Cytology and Genetics.*—2007.—**41**, N 3.—P. 167–171.

Received 28.09.12