

УДК 575.827:604.6:582.683.2

Л.А. САХНО

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев
E-mail: sakhno2007@ukr.net

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ
ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
РАПСОВОГО МАСЛА:
КЛАССИЧЕСКАЯ СЕЛЕКЦИЯ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**



*Проанализированы проблемы и достижения в селекции масличного рапса *Brassica napus L. var. oleifera*, направленной на изменение состава жирных кислот в масле семян, с использованием традиционных и генноинженерных подходов. Отмечено, что для дальнейшего прогресса в этой области оптимальным является сочетание биотехнологических разработок и методов классической селекции.*

© Л.А. САХНО, 2010

Введение

Семена рапса в настоящее время — один из важнейших источников получения растительного масла как пищевого, так и технического назначения, а также высокобелковых кормов.

Первый всплеск интереса к этой культуре наблюдался в середине XIX ст. в результате бурного развития промышленности и ее спроса на технические масла. Площадь посевов рапса в Германии достигла к тому времени 300 тыс. га. Затем рапс начал проникать в Польшу, Западную Украину (1836 г.). В 1870 г. посевы этой масличной культуры там достигали 25 тыс. га, а на протяжении последующих 30 лет возросли до 350 тыс. га [1].

В 1925 г. площадь посевов рапса в мире составляла 2,9 млн га, в том числе в Индии — 2,6 млн га, Германии — 38 тыс. га, Польше — 26 тыс. га, Франции — 18 тыс. га.

Однако увеличение производства дешевых минеральных масел, их появление на международном рынке в больших количествах для смазки и освещения вызвало в Европе в начале XX века резкое сокращение посевных площадей рапса. Они сохранились на стабильном уровне только в странах Азии, прежде всего в Индии.

В период второй мировой войны канадские фермеры начали выращивать традиционный на то время высокоэруковый рапс как альтернативный минеральным источником масел [1]. Однако для пищевых целей масло подобных сортов рапса не годилось из-за отрицательного действия эруковой кислоты на сердечно-сосудистую систему и вредного влияния глюкозинолатов на щитовидную железу и печень.

Крупномасштабный скрининг семян позволил обнаружить мутанты, у которых был нарушен синтез эруковой кислоты [2]. Позднее установили, что нарушение синтеза эруковой кислоты происходит за счет единичных точечных мутаций в двух генах, кодирующих изоформы фермента β -кетоацил CoA синтазы [3, 4].

Включение мутантных линий в селекционный процесс позволило методами классической селекции в 60-х годах XX ст. создать первые безэруковые (до 2 % эруковой кислоты и менее 30 мкМ глюкозинолатов на 1 г сухого остатка) сорта рапса Ого и Tower [5], получившие общее название «канола». Масло, полученное из семян таких сортов, по вкусовым и пищевым качествам сравнимо с подсолнечным, соевым и даже

оливковым (таблица). Термин «канола» является в настоящее время зарегистрированной торговой маркой канадской организации «Canola Council of Canada» [6].

Появление высокоурожайных безэруковых и низкоглюкозинолатных сортов рапса в связи с растущим спросом на растительные масла и кормовой белок обусловило значительное расширение посевов этой культуры и рост производства семян. Сегодня рапс занимает третье место в мировом производстве растительных масел [7]. В 2008 г. посевные площади рапса в мире составили 30 308 662 га [8]. Трансгенный рапс выращивают в четырех странах — США, Канаде, Австралии, Чили [9].

Значительные различия в биохимическом составе масла семян различных сортов рапса, созданных к настоящему времени, отражают как высокую пластичность культуры и возможности изменения свойств масла за счет генетических манипуляций, так и разнонаправленные потребности сельскохозяйственного и промышленного производств [10, 11].

Методами классической селекции можно влиять на количественные показатели масел, характерных для семян рапса. Биотехнологические методы позволяют как изменять продукцию имеющихся жирных кислот, так и получать растения рапса с характеристиками, не свойственными ему ранее. Освещению вклада классической селекции и биотехнологии в изменение жирнокислотного состава рапсового масла посвящен настоящий обзор.

Направления исследований

Исследования последних десятилетий в изучении рапса в связи усовершенствованием качества масла, получаемого из семян, предприняты в таких направлениях: повышение масличности; изменение соотношения карбоновых кислот с целью преимущественного накопления одной из них (например, олеиновой, эруковой, стеариновой); синтез не характерных для рапса жирных кислот и других соединений, которые повышают пищевую и фармацевтическую ценность масла.

Для генетических манипуляций необходимо создать базу, выявив гены, влияющие на синтез определенных жирных кислот и их накопление в масле семян, разработать адекватные, не повреждающие семена способы их крупномасштабного тестирования на содержание тех или иных веществ (белки, жирные кислоты), изучить биохимию процессов, разработать удобные модельные системы для оценки и отбора линий в условиях *in vitro*. Этим вопросам посвящены работы ряда лабораторий Германии, Канады, Франции, США, Швеции, Кореи, Японии, Австралии [12–14].

Удобной модельной системой для изучения накопления запасных липидов в семенах рапса оказалась культура эмбриоидов, полученных из микроспор [15–19]. Важным является тот факт, что для биохимического анализа берется всего один котиледон каждого эмбриоида, из отобранных эмбриоидов можно регенерировать растения с последующей высадкой в теп-

Содержание жирных кислот в растительных маслах, % [1, 6]

Жирные кислоты (упрощенная формула)	Яровая сурепица	Рапс эруковый	Кано- ла	Канола высо- коолеиновая	Олив- ки	Паль- ма	Соя	Куку- руза	Подсол- нечник
Насыщенные									
Пальмитиновая (16:0) и стеарино- вая (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

лицу и таким образом осуществлять селекцию на ранних этапах развития [15, 20, 21].

Повышение содержания олеиновой кислоты

Благодаря усилиям селекционеров удалось получить линии рапса с накоплением олеиновой кислоты 85–90 % [22, 23] в результате использования спонтанных мутантов. Искусственный мутагенез приводил к сходному увеличению количества С18:1 (до 80–86 %) [24, 25]. Выращиваемые в настоящее время в Канаде сорта Clear Valley 75 и MONOLA накапливают до 70–75 % олеиновой кислоты [22].

Биотехнологические растения рапса способны накапливать до 89 % олеиновой кислоты за счет экспрессии сенс- и антисенс Δ 12-десатурных конструкций [26–28].

Таким образом, при использовании обоих подходов (традиционная селекция и биотехнология) удастся достичь почти 30%-ного увеличения накопления олеиновой кислоты в семенах рапса.

Накопление эруковой кислоты

В последние десятилетия усилился интерес к рапсовому маслу в связи с его использованием в технических целях, в частности, для производства стали, предназначенной для химической промышленности, для создания новых полимеров, а также в качестве возобновляемого источника биотоплива [10, 14]. Мировое производство биодизеля (сложные эфиры, чаще всего метиловые, жирных кислот и низкомолекулярных спиртов), в том числе из семян рапса (главным образом в Европе), в 2006 г. составило 9,7 млн т (на 1 т биодизеля расходуется ~2,5 т семян рапса) [29, 30]. Для этих целей предпочтительны сорта с максимально возможным содержанием эруковой кислоты С22:1, превышающим 60 %.

Интерес к рапсу как культуре возрос при обнаружении растений с низким содержанием эруковой кислоты. И именно изучение особенностей накопления этой кислоты может быть, на наш взгляд, ярким примером взаимосочетания и дополнения двух подходов – классической селекции и биотехнологии – при создании высокопродуктивных растений.

Первым сортом категории HEAR (High Erucic Acid Rape) с повышенным (> 45 %) со-

держанием эруковой кислоты и низким содержанием глюкозинолатов был сорт Hero [31]. Затем были созданы сорта Mercury (54 %) [32], Castor и MilleniUM01 (55 %) [33, 34], у которых содержание эруковой кислоты в семенах возросло на 10 % по сравнению с исходным.

При скрещивании капусты *Brassica oleracea* и сурепицы *B. campestris*, диплоидных родительских видов для амфидиплоидного *B. napus* [35], удалось получить растения рапса, у которых накопление эруковой кислоты достигало 60 % [36].

Для преодоления межвидовой несовместимости при отдаленных скрещиваниях с успехом применяли биотехнологический метод соматической гибридизации. У соматических межродовых гибридов рапса с видами семейства крестоцветных, накапливающими значительное количество С22:1, наблюдали увеличение количества эруковой кислоты в семенах. Асимметричные соматические гибриды между *B. napus* (безэруковый сорт Hanna) и लेकरеллой Фендлера *Lesquerella fendleri*, характеризующиеся накоплением до 16,5 % эруковой кислоты [37], в результате ряда последующих скрещиваний с исходным сортом Gulle (35 % С22:1) и линией HEAR (50 % С22:1) в F₆ накапливали до 61,5 % эруковой кислоты [38].

У подобных гибридов между *B. napus* и катраном абиссинским *Crambe abyssinica* накопление эруковой кислоты возрастало по сравнению с исходным рапсом почти на 3 % и составляло 51 % [39].

При скрещивании высокоэруковой линии HEAR (50 % эруковой кислоты) с линией, накапливающей до 85 % олеиновой кислоты, не произошло увеличения количества эруковой кислоты, хотя предполагалось, что такая комбинация генов позволит уменьшить 18:1 десатурацию и повысить уровень олеил-СоА, что могло бы привести к возрастанию синтеза С22:1. Оказалось, что в F₃ общее количество мононенасыщенных жирных кислот все же увеличивалось и достигало 89 %, снижалось накопление полиненасыщенных (< 8 %) и насыщенных (< 3,5 %) жирных кислот [40].

Методами генетической инженерии были получены биотехнологические растения рапса с измененным накоплением С22:1 за счет экспрессии генов гетерологичных ацилтрансфераз лизофосфатидовой кислоты (*lpaat*) [41, 42]

и собственной β -кетоацил-СоА синтазы (*Bn-fae1.1*) [43], а также одновременного функционирования двух названных генов [44].

Известно, что насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи выше С18 включаются в триглицериды крестоцветных в позициях *sn-1* и *sn-3* (преимущественно пальмитиновая и стеариновая), в положении *sn-2* в основном встречаются олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты [45]. Высокая субстрат-специфичность *lpaat* рапса не допускает встраивания эруковой кислоты в триглицериды в положении *sn-2* [46]. Для семян пенника белого *Limnanthes alba* характерно накопление в масле до 90 % ненасыщенных жирных кислот за счет их встраивания и в положении *sn-2* [47].

У трансформированных растений рапса, экспрессирующих кДНК гена *lpaat* пенника белого под контролем семя-специфического напинавого промотора [41], эруковая кислота включалась и в позиции *sn-2*, однако это не привело к увеличению ее накопления в целом. Оказалось, что добиться синтеза триэруцинов таким способом не удастся: снижается количество реакций с участием эруковой кислоты в положениях *sn-1* и *sn-3* [48, 49].

У растений рапса, трансформированных *lpaat* из *Limnanthes douglasii* (пенник Дугласа), обнаружено до 40 % встраивания эруковой кислоты в триглицериды в положении *sn-2*, причем отмечено до 9 % образования триэруцинов [42].

Введение семя-специфического гена β -кетоацил-СоА синтазы рапса (*Bn-fae1.1*), выделенного из высокоэрукового сорта Askari, в геном растений низкоэрукового сорта Drakkar привело к существенному увеличению уровней накопления эйкозановой и эруковой кислот. В то же время трансформация высокоэрукового сорта не привела к значительному изменению количеств С20:1 и С22:1 [43].

Последним на сегодняшний день достижением в области создания растений рапса со сверхпродукцией эруковой кислоты является работа немецких исследователей [44], где удалось добиться накопления до 72 % эруковой кислоты в масле семян. Это стало возможным за счет гибридизации трансгенной линии 361.2В, характеризующейся сверхэкспрессией гена элонгазы жирных кислот (*fae1*) и экспрессией гена *Ld-lpaat* *Limnanthes douglasii* и за-

пасающей в результате до 63 % эруковой кислоты [44], с мутантной линией 6575-1 HELP, которая накапливает эруковую кислоту в количестве 50 % и синтезирует незначительное количество полиненасыщенных жирных кислот [40]. До этого высказывались предположения, что максимальное количество эруковой кислоты, которое может накапливаться в семенах рапса, ограничивается 66 % [38]. Накопление эруковой кислоты (до 72 %) и полиненасыщенных жирных кислот (< 4 %), характерное для F₂, оставалось стабильным в поколении F₄.

В результате экспериментов выделены перспективные высокоэруковые линии с низким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Авторы предполагают, что дальнейшее увеличение накопления эруковой кислоты возможно за счет уменьшения количества оставшихся кислот, главным образом, олеиновой, эйкозановой и полиненасыщенных жирных кислот. Этого можно достичь, по их мнению, интеграцией антисенс-последовательности гена *fad2* одновременно с генами *fae1* и *Ld-lpaat* [44].

Таким образом, при использовании мутантов [31] и традиционных скрещиваний [33, 34, 36] удалось поднять уровень накопления эруковой кислоты в рапсовом масле с 45 до 50–55 %. В результате генноинженерных манипуляций получены растения с 63%-ным накоплением эруковой кислоты [44]. Сочетание двух подходов дало возможность создать растения рапса, в семенах которых накапливается до 72 % эруковой кислоты [44], что является на сегодня максимальным достижением. Примечательно, что авторы посвятили свою работу 80-летнему юбилею одного из выдающихся немецких ученых – профессора Герхарда Ребелена (*Gerhard Röbbelen*), занимающегося изучением рапса.

Накопление стеариновой кислоты

Для преимущественного синтеза и накопления стеариновой кислоты (18:0) были получены трансгенные растения рапса, несущие семя-специфическую антисмысловую генетическую конструкцию с геном стеарил-АСР (acyl carrier protein – ацил-несущий протеин) десатуразы из *Brassica rapa* [50]. Для исходного рапса характерно накопление всего 1 % стеа-

риновой кислоты. В трансформированных растениях концентрация и ферментативная активность стеарил-АСР десатуразы в развивающихся семенах уменьшались, уровни накопления стеариновой кислоты увеличивались до 2–40 %. Изменения не затрагивали состава липидов в листьях, что говорит об эффективности используемого семя-специфического промотора.

Подобные растения были получены и при введении антисмысловой последовательности собственной стеарил-АСР десатуразы под контролем FatB4 семя-специфического промотора из *Cuphea lanceolata*, что привело к увеличению синтеза стеариновой кислоты в 10 раз (до 32 %) у генотипов с низким содержанием эруковой кислоты и в 4 раза (до 4 %) при использовании для трансформации высокоэруковой линии [51].

Использование другого подхода, направленного на увеличение активности фермента FatA, который гидролизует вновь синтезированные С18:1-ацил АСР в пластидах, что приводит к возрастанию количества С18:0, дало возможность получить растения рапса сорта Westar, накапливающие до 10,1 % стеариновой кислоты за счет экспрессии гена *FatA* сои [26], и сорта Quantum – до 22 % стеариновой кислоты за счет экспрессии гена *FatA* мангостина (*Garcinia mangostana*) [52]. В результате трансформации мутированным геном *FatA* мангостина стеариновой кислоты накапливалось на 55–68 % больше, чем при трансформации нативной формой [53].

Синтез не свойственных рапсу насыщенных жирных кислот

С помощью генноинженерных манипуляций стало возможным получение растений рапса, накапливающих жирные кислоты, не характерные для него. Следует отметить, что гетерологичная экспрессия генов, влияющих на синтез жирных кислот, особенно неспецифических жирных кислот для рапса, сопровождается пока относительно низким уровнем их накопления [54].

Изменения состава жирных кислот в сторону преимущественного синтеза лауриновой кислоты (С12:0) удалось добиться в результате введения в ядерный геном гена фермента

МСТЕ – лаурил-АСР тиоэстеразы лавра калифорнийского *Umbellularia californica* – под контролем либо семя-специфического напинового промотора, либо 35S промотора вируса мозаики цветной капусты [55, 56]. При экспрессии под контролем семя-специфического напинового промотора наблюдалось накопление лаурата в количестве до 60 М/% общего содержания триглицеридов в семенах, что незначительно уступает уровню накопления лауриновой кислоты в донорном растении, лавре калифорнийском (65 М/%). Отмечено, что прямая зависимость между уровнем экспрессии фермента МСТЕ и содержанием лауриновой кислоты была линейной в пределах 30–35 М/% накопления этой кислоты. У трансформантов с более высоким уровнем экспрессии гена наблюдалась иная картина: повышение активности МСТЕ в 8–10 раз приводило лишь к двукратному возрастанию накопления лауриновой кислоты (от 30 до 59 М/%). Было выяснено, что высокая активность МСТЕ индуцирует β-оксидазную активность, которая по сравнению с контролем возрастает в 3–10 раз. Во всех изученных случаях – в пределах каждой исследованной части растения (листья, семена), под контролем каждого из введенных промоторов (напиновый, 35S) – скорости окисления лаурил-СоА были пропорциональны уровню МСТЕ. Таким образом, растения с наивысшей тиоэстеразной активностью характеризовались самой высокой оксидазной активностью лаурил-СоА. Общее количество масла в семенах существенно не менялось [57].

Одновременная экспрессия генов МСТЕ и 12:0-СоА *lpaat* кокоса (*Cocos nucifera*) в растениях рапса приводило к образованию до 40 % лауратов за счет включения лауриновой кислоты в позиции sn-2. Общее количество С12:0 повысилось до 67 %. Следует отметить, что для сочетания двух трансгенов в одном растении использовали скрещивание двух трансформированных линий [58], т.е. метод классической селекции.

Не характерные для рапса каприловая (С8:0) и каприновая (С10:0) кислоты накапливались в значительных количествах (до 40 %) в трансформированных семенах благодаря экспрессии гена *FatB2* из *Cuphea hookeriana*, при этом

происходило уменьшение долей линолевой (C18:2) и α -линоленовой (C18:3) кислот [59].

В результате трансформации рапса генами тиоэстеразы и 3-кетоацил-АСР синтазы из *Cuphea lanceolata* получены растения с измененным уровнем накопления каприловой, каприновой, лауриновой и миристиновой кислот [60, 61]. В составе ацилглицеридов трансгенных растений преобладали содержащие каприловую, каприновую, лауриновую, миристиновую, пальмитиновую, стеариновую, олеиновую, линолевою, арахидиновую (C20:0), бегеновую (C22:0), лигноцериную кислоты (C24:0). У исходных растений преимущественно синтезировались жиры, в состав которых входили пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая кислоты. Жирные кислоты со средней длиной углеродной цепи присоединялись к глицерину в позициях *sn*-1 и *sn*-3, в положении *sn*-2 встраивались в основном молекулы линолевой и α -линоленовой кислот.

Повышение общего количества жирных кислот

Для повышения масличности семян рапса была предпринята успешная попытка экспрессии гена дрожжей, кодирующего цитозольную глицерол-3-фосфат дегидрогеназу (*gpd1*), под контролем семя-специфического напинного промотора [62]. При этом в 3–4 раза возрастал уровень глицерол-3-фосфатов в развивающихся семенах, что приводило к 40%-ному увеличению количества липидов при сохранении обычного содержания белков. Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрация глицерол-3-фосфата является одним из лимитирующих факторов накопления масла в семенах рапса.

При изучении индуцированного мутанта рапса с повышенным содержанием пальмитиновой (C16:0) кислоты выяснилось, что исследуемый признак отрицательно коррелирует с общим накоплением масла в семенах. Так, при повышении уровня пальмитиновой кислоты с 4,5 % (исходный генотип) до 9,2 % (мутантная линия) накопление масла в семенах снижалось на треть (61,6 и 44,2 % соответственно) [63].

На накопление жирных кислот может влиять активность ϵ -циклаз, вовлеченных в биосинтез каротиноидов. При уменьшении

(благодаря трансформации) экспрессии ликопен ϵ -циклазы трансгенные семена рапса накапливали более высокие количества (по сравнению с контролем) β -каротина, зеаксантина, виолаксантина и лютеина, однако одновременно наблюдалось уменьшение общего количества жирных кислот и незначительные изменения в их соотношении [64].

Повышение пищевой ценности рапсового масла за счет накопления нехарактерных полиненасыщенных жирных кислот

Пищевую ценность рапсового масла можно повысить, если оно будет содержать такие ценные диетические кислоты, как арахидиновая (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$), эйкозапентаеновая (C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$), а также докозагексаеновая (C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$), входящие в состав фосфолипидов клеточных мембран и являющиеся предшественниками простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов в организмах животных. Однако цветковые растения не могут синтезировать высшие полиненасыщенные жирные кислоты (с длиной углеродной цепи свыше 20): получить растения, осуществляющие синтез таких кислот можно только биотехнологическими методами. Решению этой проблемы посвящены работы ряда лабораторий [65–71].

В организмах животных, за исключением некоторых насекомых, не синтезируются линолевая и линоленовая кислоты, хотя они необходимы им для нормального функционирования. Животные различаются по способности преобразовывать полиеновые жирные кислоты-предшественники. Так, хищники не могут синтезировать высшие полиеновые жирные кислоты, они должны получать все нужные им кислоты в готовом виде из мяса и рыбы. Организм человека может превращать жирные кислоты, однако делает это не очень активно. Существуют популяционные различия: у эскимосов, индейцев синтез высших полиеновых жирных кислот идет в значительно меньшей степени, чем у представителей европеоидов. Вероятно, индивидуальные различия в способности превращать полиеновые жирные кислоты приводят к тому, что не все люди могут быть вегетарианцами [72].

Считается, что оптимальным соотношением линолевой (и ее производных, ω -6) и лино-

леновой (и ее производных, ω -3) кислот в питании человека должно быть 5:1 [73]. В растительных маслах оно нарушается из-за преобладания линолевой кислоты (таблица). Рыбные ресурсы и, соответственно, количество липидов с оптимальным соотношением ω -3 и ω -6 жирных кислот, которые могут быть использованы в пищу, ограничены [74], поэтому и возникает необходимость задуматься о создании растений, с помощью которых можно восполнить дефицит полиненасыщенных высших жирных кислот.

Исходным материалом для введения генов Δ 6- и Δ 5-десатураз, Δ 6 элонгазы выбраны сорта рапса с высоким содержанием олеиновой кислоты — High Oleic (HO)-Rapeseed (80 % олеиновой, 9 % линолевой и 3 % линоленовой), высоким содержанием линоленовой кислоты HiLLa-Raps (50 % олеиновой, 23 % линолевой и 24 % линоленовой) и 00-Rapeseed (63 % олеиновой, 20 % линолевой и 9 % линоленовой) [12]. Предполагается, что удастся осуществить превращения, представленные на схеме.

Перспективным может быть введение кДНК, изолированной из микроводоросли *Mantoniella squamata*. Оно определяет координированный, исключительно ацил-СоА-зависимый путь трансэтерификации 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 эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты, так и ряд новых кислот, что подтверждает функциональность введенного биосинтетического пути для полиненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью [75]. Проблема заключается в пока достаточно низком уровне накопления желательных жирных кислот, преодоление которой, по мнению авторов, может определяться поиском более эффективных десатураз и элонгаз [67, 76–78].

Шагом вперед в решении задачи повышения накопления полиненасыщенных жирных кислот можно считать получение растений рапса, накапливающих до 16–23 % стеариновой ($C_{18:4\Delta^{6,9,12,15}}$) кислоты [79], которая, хотя и в меньшей степени, чем эйкозапентаеновая, но увеличивает ω 3 индекс и уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний [81, 82]. Трансформированные растения экспрессировали гетерологичные Δ 6- и Δ 12-десатуразы из гриба *Mortierella alpina* и введенную собственную Δ 15-десатуразу. Введение трех генов в одной кассете вело к накоплению стеариновой кислоты в количестве 16 % общего количества жирных кислот, в то время как при отдельной трансформации (кДНК десатураз гриба и Δ 15-десатуразой рапса) с последующей гибридизацией трансформированных растений этот показатель возрастал на 7 %



Схема получения полиненасыщенных жирных кислот с длинной углеродной цепью [12]

[80]. Эти эксперименты являются еще одним примером получения оптимального результата при сочетании двух подходов — классической селекции и биотехнологии.

Введение в геном рапса кДНК $\Delta 5$ -десатуразы из гриба *Mortierella alpina* позволило обеспечить синтез таксоловой (C18:2 $\Delta 5,9$) (из олеиновой) и пиноленовой (C18:3 $\Delta 5,9,12$) (из линоленовой) кислот благодаря ферментативной активности гетерологичного белка [82], а одновременная экспрессия генов $\Delta 6$ - и $\Delta 12$ -десатураз из того же гриба привела к накоплению ценного фармацевтического продукта — γ -линоленовой кислоты в количестве до 43 % [83].

Известно, что один из конъюгированных изомеров линоленовой кислоты, пуниковая кислота (C18:3 $\Delta 9,11,13$), найденная в семенах граната и трихозанта *Tricosanthes kirilovii*, влияет на снижение массы животных за счет уменьшения накопления жиров. Введением кДНК, полученной из семян *Tricosanthes kirilovii* и кодирующей конъюгазу, которая превращает линолеовую кислоту в пуниковую, удалось добиться накопления желаемой кислоты в масле семян рапса, хотя и в незначительных количествах (~2,5 % от общего количества масла) [84]. Однако и этого оказалось достаточно для ожидаемого терапевтического эффекта: даже содержание 0,25 % (по весу) пуниковой кислоты в диете мышей в течение четырех недель приводило к снижению их массы за счет изменения липидного метаболизма (возрастания карнитин-пальмитилтрансферазной активности). Влияние генетически модифицированного масла рапса оказалось более эффективным, чем равного количества масла из граната.

Заключение

В заключение следует отметить, что выращиваемые в настоящее время сорта рапса с широким спектром изменений в составе жирных кислот масла получены преимущественно благодаря успехам классической селекции. Возделываемые в четырех странах мира и зарегистрированные в странах ЕС трансгенные сорта отличаются устойчивостью к ряду гербицидов (Roundup, BASTA) за счет введения соответствующих чужеродных генов (*epsps*, *bar*). С 1996 г. в США и с 1997 г. в Канаде выращи-

вается трансгенный сорт рапса Laurical с повышенным синтезом лауриновой кислоты.

Результаты экспериментов по изменению жирнокислотного состава масла, синтезу не присущих ранее этой культуре жирных кислот и других соединений, повышению общего накопления масла, общего азота, каротиноидов генноинженерными методами внесли существенный вклад в понимание закономерностей и особенностей процессов синтеза и накопления жирных кислот в семенах рапса и других масличных растений. Однако они не нашли пока широкого применения в практике сельского хозяйства по ряду причин, в том числе из-за недостаточной эффективности полученных трансформированных растений, а также негативно сформированного общественного мнения. Можно надеяться, что эти преграды будут преодолены, и генетически модифицированные растения, вовлеченные в селекционный процесс, послужат основой для получения новых, высокопродуктивных, ценных сортов растений, в частности масличного рапса *Brassica napus* L. var. *oleifera*, поскольку только сочетание методов классической селекции и биотехнологии дает возможность получить оптимальный результат.

L.O. Sakhno

FATTY ACID COMPOSITION VARIABILITY OF RAPESEED OIL: CLASSICAL BREEDING AND BIOTECHNOLOGY

The problems and achievements in the rapeseed *Brassica napus* L. var. *oleifera* breeding directed on the change of fatty acid composition in seed oil with the use of traditional and genetic engineering approaches are analyzed. It is noticed that the combination of biotechnological workings out and methods of classical breeding is the optimum for the further improvement of rapeseed oil composition.

Л.О. Сахно

ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ РІПАКОВОЇ ОЛІЇ: КЛАСИЧНА СЕЛЕКЦІЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Проаналізовано проблеми і досягнення в селекції олійного ріпака *Brassica napus* L. var. *oleifera*, спрямованої на змінення складу жирних кислот в насіннєвій олії, з використанням традиційних та генноінженерних підходів. Зазначено, що для подальшого прогресу в даній галузі оптимальним є поєднання біотехнологічних розробок і методів класичної селекції.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гольцов А.А., Ковальчук А.М., Абрамов В.Ф., Милащенко Н.З. Рапс, сурепица. – М.: Колос, 1983. – 192 с.
2. 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. – **41**. – P. 218–219.
3. Fourmann M., Barret P., Renard M. et al. The two genes homologous to *Arabidopsis* FAE1 co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus* // Theor. Appl. Genet. – 1998. – **96**. – P. 852–858.
4. Katavic V., Mietkiewska E., Barton D.L. et al. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single aminoacid substitution // Eur. J. Biochem. – 2002. – **269**, № 22. – P. 5625–5631.
5. Stefansson B.R., Downey R.K. Rapeseed // Harvest of gold: the history of field crop breeding in Canada / Eds A.R. Slinkard, D.R. Knott. – Saskatoon : Univ. Ext. Press, 1995. – P. 140–152.
6. http://www.canola-council.org/oil_tech.html.
7. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.
8. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>: ISAAA Brief-39 – 2008: Executive summary.
9. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
10. Низова Г.К., Дубовская А.Г. Биохимическое изучение ярового и озимого рапса из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова // Аграр. Россия. – 2006. – № 6. – С. 37–40.
11. Carlsson A.S., Clayton D., Salentijn E., Toonen M. Rapeseed (*Brassica napus*) // Oil Crop Platforms For Industrial Uses / Ed. D. Newbury, 2007. – P. 17–48.
12. Leckband G., Frauen M., Friedt W. NAPUS 2000. Rapeseed (*Brassica napus*) breeding for improved human nutrition // Food Res. Int. – 2002. – **35**, № 2/3. – P. 273–278.
13. Murphy D.J. Molecular breeding strategies for the modification of lipid composition // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. – 2006. – **42**. – P. 89–99.
14. Scarth R., Tang J. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches // Crop. Sci. – 2006. – **46**. – P. 1225–1236.
15. Albrecht S., Möllers C., Röbbelen G. Selection *in vitro* for erucic-acid content in segregating populations of microspore-derived embryoids of *Brassica napus* // Plant Breed. – 1994. – **114**, № 3. – P. 210–214.
16. Weselake R.J. Lipid biosynthesis in cultures of oilseed rape // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. – 2000. – **36**. – P. 338–348.
17. Möllers C., Rücker B., Stelling D., Schierholt A. *In vitro* selection for oleic and linoleic acid content in segregating populations of microspore derived embryos of *Brassica napus* // Euphytica. – 2000. – **112**. – P. 195–201.
18. Möllers C., Schierholt A. Genetic variation of palmitate and oil content in a winter oilseed rape doubled haploid population segregating for oleate content // Crop. Sci. – 2002. – **42**. – P. 379–384.
19. Nath U.K., Gosmani G., Clemens R., Becker H.C., Möllers C. Inheritance and variation of erucic content in a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) doubled haploid population // Mol. Breed. – 2009. – **23**, № 1. – P. 125–138.
20. Velasco L., Möllers C. Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy // Euphytica. – 2002. – **123**. – P. 89–93.
21. Hom N.H., Becker H.C., Möllers C. Non-destructive analysis of rapeseed quality by NIRS of small seed samples and single seeds // Euphytica. – 2007. – **153**. – P. 27–34.
22. Scarth R., McVetty P.B.E. Designer oil canola – a review of new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types // Proc. 10th Int. Rapeseed Cong. – Canberra, 1999. – P. 57.
23. Vilkki J.P., Tanhuanpää P.K. Breeding of high oleic acid spring turnip rape in Finland // Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. – Cambridge, 1995. – P. 386–388.
24. Rücker B., Röbbelen G. Development of high oleic acid winter rapeseed // Ibid. – P. 389–391.
25. Schierholt A., Rücker B., Becker H.C. Inheritance of high oleic acid mutations in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) // Crop. Sci. – 2001. – **41**. – P. 1444–1449.
26. Hitz W.D., Mavis C.J., Ripp K.G., Reiter R.J. The use of cloned rapeseed genes for the cytoplasmic fatty acid desaturases and the plastid acyl-ACP thioesterases to alter relative levels of polyunsaturated and saturated fatty acids in rapeseed oil // Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. – Cambridge, 1995. – P. 470–472.
27. Kinney A.J. Genetic modification of the storage lipids of plants // Curr. Opin. Biotechnol. – 1994. – **5**. – P. 144–151.
28. Stoutjesdijk P.A., Hurlestone C., Singh S.P., Green A.G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous $\Delta 12$ -desaturase // Biochem. Soc. Transactions. – 2000. – **28**, № 6. – P. 938–940.
29. Дебабов В.Г. Биотопливо // Биотехнология. – 2008. – № 1. – С. 3–14.
30. Gressel J. Transgenic are imperative for biofuel crops // Plant Sci. – 2008. – **174**. – P. 246–263.
31. Scarth R., McVetty P.B.E., Rimmer S.A., Stefansson B.R. Hero summer rape // Can. J. Plant Sci. – 1991. – **71**. – P. 865–866.
32. Scarth R., McVetty P.B.E., Rimmer S.A. Mercury high erucic acid low glucosinolate summer rape // Can. J. Plant Sci. – 1995. – **75**. – P. 205–206.
33. McVetty P.B.E., Rimmer S.A., Scarth R. Castor high erucic, acid low glucosinolate summer rape // Can. J. Plant Sci. – 1998. – **78**. – P. 305–306.

34. McVetty P.B.E., Scarth R., Rimmer S.A. Milleni-UM01 summer rape // Can. J. Plant Sci. – 1999. – **79**. – P. 251–252.
35. U.N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode to fertilization // Jap. J. Bot. – 1935. – **7**, № 3. – P. 389–452.
36. Lühs W., Friedt W. Breeding high-erucic acid rapeseed by means of *Brassica napus* resynthesis // Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. – Cambridge, 1995. – P. 449–451.
37. Skarzhinskaya M., Landgren M., Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats // Theor. Appl. Genet. – 1996. – **93**, № 8. – P. 1242–1250.
38. Schröder-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. – **99**, № 1/2. – P. 108–114.
39. Wang Y.P., Sonntag K., Rudloff E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica* // Theor. Appl. Genet. – 2003. – **106**. – P. 1147–1155.
40. Sasongko N.D., Möllers C. Towards increasing erucic acid content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the combination with genes for oleic acid // J. Amer. Oil. Chem. Soc. – 2005. – **82**, № 6. – P. 445–449.
41. Lassner M.W., Levering C.K., Davies H.M., Knutzon D.S. Lysophosphatidic acid acyltransferase from Meadow foam mediates insertion of erucic acid at the *sn*-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil // Plant Physiol. – 1995. – **109**. – P. 1389–1394.
42. Weier D., Hanke C., Eickelkamp A. et al. Trierucoylglycerol biosynthesis in transgenic plants of rapeseed (*Brassica napus* L.) // Lipid-Fett. – 1997. – **99**, № 5. – P. 160–165.
43. Han J., Lühs W., Sonntag K. et al. Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. // Plant Mol. Biol. – 2001. – **46**, № 2. – P. 229–239.
44. 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. – **118**. – P. 765–773.
45. Mattson F.N., Volpenhein R.A. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats // J. Biol. Chem. – 1961. – **236**, № 7. – P. 1891–1894.
46. Sun C., Cao Y-Z., Huang A.H.C. Acyl coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize, and rapeseed // Plant Physiol. – 1988. – **94**. – P. 1199–1206.
47. Phillips B.E., Smith C.R., Tallent W.H. Glycerides of *Limnanthes douglasii* seed oil // Lipids. – 1971. – **6**. – P. 93–99.
48. James D.W., Lim E., Keller J. et al. Directed tagging of the Arabidopsis *FATTY ACID ELONGATION (FAE1)* gene with the maize transposon *Activator* // Plant Cell. – 1995. – **7**. – P. 309–319.
49. Lassner M.W., Lardizabal K., Metz J.G. A jojoba Δ -ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants // Plant Cell. – 1996. – **8**. – P. 281–292.
50. Knutzon D.S., Thompson G.A., Radke S. E. et al. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1992. – **89**. – P. 2624–2628.
51. Zarhloul M.K., Stoll C., Lühs W. et al. Breeding high-stearic oilseed rape (*Brassica napus*) with high- and low-erucic background using optimized promoter-gene constructs // Mol. Breed. – 2006. – **18**. – P. 241–251.
52. Hawkins D.J., Kridl J.C. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola // Plant J. – 1998. – **13**. – P. 743–752.
53. Facciotti M.T., Bertain P.B., Yuan L. Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase // Nat. Biotech. – 1999. – **17**. – P. 593–597.
54. Jaworski J., Cahoon E.B. Industrial oils from transgenic plants // Curr. Opin. Plant Biol. – 2003. – **6**, № 2. – P. 178–184.
55. Voelker T.A., Hayes T.R., Cranmer A.M., Turner J.C., Davies H.M. Genetic engineering of a quantitative trait: Metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed // Plant J. – 1996. – **9**. – P. 229–241.
56. Eccleston V.S., Cranmer A.M., Voelker T.A., Ohlrogge J.B. Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauroyl acyl carrier protein thioesterase // Planta. – 1996. – **198**, № 1. – P. 46–53.
57. Eccleston V.S., Ohlrogge J.B. Expression of lauroyl-acyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathway for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation // Plant Cell. – 1998. – **10**. – P. 613–621.
58. Knutzon D.S., Hayers T.R., Wyrick A. et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the *sn*-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels // Plant Physiol. – 1999. – **120**. – P. 739–746.
59. Dehesh K., Jones A., Knutzon D.S., Voelker T.A. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a

- thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana* // Plant J. – 1996. – 9, № 2. – P. 167–172.
60. Wiberg E., Edwards P., Byrne J. et al. The distribution of caprylate, caprate and laurate in lipids from developing and mature seeds of transgenic *Brassica napus* L. // Planta. – 2000. – 212. – P. 33–40.
 61. Beermann C., Winterling N., Green A. et al. Comparison of the structures of triacylglycerol from native and transgenic medium-chain fatty acid-enriched rape seed oil by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry (LC – APC-ITMS) // Lipids. – 2007. – 42, № 4. – P. 383–394.
 62. Vigeolas H., Waldek P., Zank T., Geigenberger P. 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 Biotech. J. – 2007. – 5, № 3. – P. 431–441.
 63. Schnurbusch T., M?llers C., Becker H.C. A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content // Plant Breed. – 1999. – 119, № 2. – P. 141–144.
 64. Yu B., Lydiate D.J., Young L.W. et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // Transgenic Res. – 2008. – 17, № 4. – P. 573–585.
 65. Truksa M., Wu G., Vrinten P., Qiu X. Metabolic engineering of plants to produce very long-chain polyunsaturated fatty acids // Transgenic Res. – 2006. – 15. – P. 131–137.
 66. Truksa M., Vrinten P., Qiu X. Metabolic engineering of plants for polyunsaturated fatty acid production // Mol. Breed. – 2009. – 23, № 1. – P. 1–11.
 67. Damude H.W., Zhang H., Farrall L. et al. Identification of bifunctional Δ^{12}/ω^3 fatty acid desaturases for improving the ratio of ω^3 to ω^6 fatty acids in microbes and plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – 103, № 25. – P. 9446–9451.
 68. Abbadi 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. – 16. – P. 2734–2748.
 69. Qi B., Fraser T., Mugford S. et al. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants // Nat. Biotech. – 2004. – 22. – P. 739–745.
 70. Domergue F., Abbadi A., Heinz E. Relief for fish stocks: oceanic fatty acids in transgenic oilseeds // Trends Plant Sci. – 2005. – 10, № 3. – P. 112–116.
 71. Kinney A.J., Cahoon E.B., Hitz W.D. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants // Biochem. Soc. Trans. – 2002. – 30, № 6. – P. 1099–1103.
 72. Васьковский В.Е. Липиды // Сорос. образоват. журн. – 1997. – № 3. – С. 32–37.
 73. Trautwein E.A. n-3 Fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2001. – 103. – P. 45–55.
 74. 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>.
 75. Hoffmann M., Wagner M., Abbadi A. et al. Metabolic engineering of ω^3 -VLCPUFA production by an exclusively acyl-CoA-dependent pathway // J. Biol. Chem. – 2008. – 283, № 33. – P. 22352–22362.
 76. 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. – 160. – P. 779–802.
 77. Kumon Y., Kamisaka Y., Tomita N. et al. Isolation and characterization of a Δ^5 -desaturase from *Oblongichytrium* sp. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – 72, № 8. – P. 2224–2227.
 78. 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* // Marine Biotech. – 2009. – 11, № 1. – P. 17–23.
 79. Ursin V.M. Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids // J. Nutrition. – 2003. – 133. – P. 4271–4274.
 80. 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 // Amer. J. Clin. Nutr. – 2003. – 77. – P. 1140–1145.
 81. 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. – 43. – P. 805–811.
 82. Knutzon D.S., Thurmond J.V., Huang Y-S. et al. Identification of Δ^5 -desaturase from *Mortierella alpinaby* heterologous expression in bakers' yeast and canola // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, № 45. – P. 29360–29366.
 83. Liu J.-W., DeMichele S., Bergana M. et al. Characterization of oil exhibiting high γ -linolenic acid from a genetically transformed canola strain // J. Amer. Oil. Chem. Soc. – 2001. – 78, № 5. – P. 489–493.
 84. 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. – 55, № 9. – P. 3741–3748.

Поступила 21.10.09