

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОБЕГА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН СИНТЕЗА 3-ОКСИ-3-МЕТИЛГЛУТАРИЛ-КоА РЕДУКТАЗЫ (*HMG1*) В ПРЯМОЙ И ОБРАТНОЙ ОРИЕНТАЦИЯХ ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОМОТОРА**

© 2016 г. А. А. Ермошин<sup>1</sup>, И. С. Киселёва<sup>1</sup>, С. А. Борцова<sup>1</sup>, Ю. В. Санаева<sup>1</sup>, В. В. Алексеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Уральский федеральный университет им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина  
620000 г. Екатеринбург, пр. Ленина, 51

<sup>2</sup>Филиал института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
142290 г. Пушкино, пр. Науки, 6  
E-mail: bos\_o@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

Окончательный вариант получен 03.02.2016 г.

Фермент 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза (*HMG1*) катализирует реакцию образования мевалоновой кислоты – ключевого соединения цитозольного пути синтеза изопреноидов. У трансгенных растений табака, экспрессирующих ген синтеза этого фермента (*HMG1*) в смысловой и антисмысловой ориентациях относительно конститутивного промотора, были изучены показатели роста стебля и листа. Высота трансгенных растений в сравнении с контрольными достоверно не отличалась, однако растения со смысловой копией гена были достоверно выше растений с антисмысловой копией. Площадь листа у растений с дополнительной копией гена *HMG1* также была больше. В листьях трансгенных растений число клеток мезофилла в расчете на единицу площади было меньше, при этом их объем существенно не менялся ни в одном из вариантов, что позволяет предположить изменение плотности упаковки клеток в листе.

**Ключевые слова:** трансгенные растения табака, ген *HMG1*, высота побега, площадь листа, мезофилл.

**DOI:** 10.7868/S0475145016040042

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение тонких механизмов роста и развития растений в целом и листьев, в частности, остается одной из главных тем современной биологии развития растений. Процессы роста и развития управляются огромным количеством взаимодействующих генов и продуктов их экспрессии. Так, в формировании листа задействованы гены, прямо или косвенно влияющие на его онтогенез. Например, гены экспансинов и транскрипционных факторов непосредственно влияют на развитие листа (Шарова, 2007; Кулуев и др., 2013). Другие действуют опосредовано, например, гены синтеза фитогормонов или компонентов мембран клеток и клеточной стенки (Clouse, 2000; Schaller, 2003). Ко второй группе генов можно отнести представителей семейства *HMG*, кодирующих фермент 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу, который отвечает за образование мевалоновой кислоты, предшественника биосинтеза цитозольных изопреноидов, таких как стерины мембран клеток, фитогормоны брассиностероиды, изопентенильный фрагмент боковой цепи цитокининов, боковые цепи убихинонов и пренилированных

белков (Vach, 1986). Все эти соединения могут влиять на процессы роста и развития растений.

Цель данной работы – изучить роль усиленной и подавленной (за счет стратегии антисмысловых РНК) экспрессии гена *HMG1* в формировании побега табака.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта “Самсун” (контроль) и его трансгенные варианты, полученные методом агробактериальной трансформации. Использовали генетические конструкции, содержащие ген *HMG1* из *Arabidopsis thaliana* в прямой или обратной ориентации относительно двойного промотора вируса мозаики цветной капусты 35 SS CaMV, в растительном векторе pSS с селективным геном *nptII* под контролем агробактериальных регуляторных элементов. Плазмидные генетические конструкции (Поройко и др., 2000) были любезно предоставлены для работы д. б. н., с. н. с. Е.Б. Рукавцовой и д. б. н., проф. Я.И. Бурьяновым (лаборатория биотехнологии растений ФИБХ

РАН, г. Пушкино). Изучены 4 линии растений с антисмысловой ориентацией гена (А-линии) и 3 линии со смысловой ориентацией (С-линии). В каждой линии — 3–5 растений. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения (К) и растения, трансформированные “пустым” вектором и прошедшие через культуру тканей, — трансгенный контроль (линия рSS).

Трансгенную природу растений подтверждали методом ПЦР с праймерами к целевому и маркерному генам (Поройко и др., 2000); использовали реактивы фирмы “Евроген” (Россия); амплификацию проводили в термоциклере “Терцик” (ДНК-технологии, Россия). ДНК выделяли быстрым методом по Эдвардс (Edwards, 1991) с дополнительной очисткой хлороформом.

Экспрессию целевого гена оценивали методом ОТ-ПЦР. Перед выделением тотальной РНК растительный материал выравнивали по массе; для ОТ-ПЦР концентрацию РНК выравнивали во всех образцах. РНК выделяли с помощью тризола, кДНК получали с использованием набора “MMLV RT kit” (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Об экспрессии гена судили по интенсивности свечения продукта в агарозном геле после окрашивания бромистым этидием.

Отсутствие агробактериальной инфекции подтверждали ПЦР-реакцией к фрагменту гена *virB* (Лебедев и др., 2010) и посевом гомогената асептически выращенных тканей растений на среду LB.

Определяли содержание неомыляемого остатка липидов, как фракции обогащенной изопреноидами, и стериннов, как одного из продуктов мевалонатного пути. Липиды экстрагировали из сухого растительного материала по методике Фолч (Folch, 1957). Сумму соединений неомыляемого остатка определяли гравиметрически после омыления липидов в экстрактах. Содержание стериннов определяли в неомыляемом остатке спектрофотометрически (Кандюк, 2002) с реактивом Либермана-Бурхарда по калибровочной кривой, используя в качестве стандарта раствор стигмастерина (“Serva”).

Растения выращивали в закрытом грунте при естественном фотопериоде с мая по октябрь. Посадочный материал микроклонально размножали и культивировали в течение четырех недель на среде МС с добавлением 3% сахарозы и 50 мг/л сульфата канамицина, после чего пересаживали в грунт.

В фазу цветения измеряли высоту растения, длину (вдоль главной жилки) и ширину (в средней части) листа, площадь листа (весовым методом), сухую массу. У листьев 5-го яруса от уровня почвы (далее в тексте — лист нижнего яруса или более старый лист) и у 5-го от соцветия (по тексту — лист верхнего яруса или молодой лист), отличавшихся возрастом, определяли показатели мезострукту-

ры фототрофных тканей листа (Мокроносов, Борзенкова, 1978) с использованием микроскопа Meiji (Япония), видеокамеры Vision v400 (Австрия) и программы SiamsMesoPlant. Определены число клеток в единице площади листа, объем клеток губчатого и столбчатого мезофилла, индекс мембран клеток (ИМК) как отношение площади поверхности всех мезофильных клеток к площади листа, число клеток в целом листе (путем умножения числа клеток в единице площади листа на его площадь).

На гистограммах показаны значения средних и ошибки среднего по “смысловым” (С-линии) или “антисмысловым” (А-линии) линиям. Усреднение данных в этом случае позволяет снизить эффект соматоклональной вариабельности трансгенных линий. Достоверность различий между вариантами оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни, используя пакет прикладных программ “Statistica 6.0” (StatSoft).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате агробактериальной трансформации фрагментов листа асептически выращенных растений получены канамицин-резистентные растения табака. В отобранных линиях отсутствовала бактериальная контаминация (подтверждено методом ПЦР и посевом гомогената растительных тканей на бактериальную среду). Методом ПЦР показана инсерция целевого гена *HMG1* и маркерного гена *nptII*, методом ОТ-ПЦР — экспрессия целевого гена. У двух С-линий выявлено увеличение содержания фракции неомыляемого остатка липидов листьев, для одной А-линии — уменьшение. Значительная часть неомыляемого остатка состоит из изопреноидов, часть из которых — стерины. У трансгенных линий содержание стериннов существенно не отличалось от контрольных, за исключением одной А-линии (таблица).

Высота трансгенных растений через три месяца после посадки в грунт составила от 108 до 174 см и достоверно не отличалась в сравнении с контрольными (144 см). Тем не менее, “смысловые” растения были достоверно выше “антисмысловых” в среднем на 29 см.

Число листьев на главном побеге варьировало от 27 до 40, однако различия были несущественными: трансгенные линии, в отличие от контроля, имели на 1–2 листа больше, не зависимо от вида генетической конструкции. При этом размеры листьев отличались. Так, у С-линий длина листовой пластинки более молодого листа была на 29.2% больше, чем у контрольных растений, а у А-линий короче на 17.4%. При сравнении более старых листьев трансгенных и контрольных линий, отличий в их длине практически не выявлено (рис. 1).

## Доказательство трансгенной природы растений и экспрессии генетической конструкции

Линия	ПЦР с праймерами к генам			ОТ-ПЦР с праймерами к гену <i>hmg1</i>	Содержание соединений неомыляемого остатка, мг/г массы листьев	Содержание стериннов, мг/г массы листьев	Рост на среде с Кп	Микробиологический посев
	<i>nptII</i>	<i>hmg1</i>	<i>virB</i>					
Контроль	–	–	–	–	41 ± 0.8	9.1 ± 2.0	–	–
pSS (трансгенный контроль)	+	–	–	–	н/о	7.2 ± 2.5	+	–
C21	+	+	–	+	46 ± 0.9*	6.8 ± 2.5	+	–
C24	+	+	–	+	43 ± 0.1*	9.3 ± 2.0	+	–
C26	+	+	–	+	40 ± 5.5	9.2 ± 2.1	+	–
A22	+	+	–	+	н/о	н/о	+	–
A23	+	+	–	+	40 ± 1.0	3.9 ± 0.4*	+	–
A24	+	+	–	+	37 ± 2.9	н/о	+	–
A27	+	+	–	+	45 ± 4.0	н/о	+	–

\* Отличия от контроля достоверны при  $p \leq 0.05$ , н/о – показатель не определяли.

Соответственно, и отличия по площади листьев (рис. 1) выражены сильнее у молодых листьев. Показано, что площадь нижнего листа у С-линий в сравнении с контрольными была в 1.25 раза больше, а у А-линий, как правило, меньше, чем в контрольном варианте (в среднем на 5%). Более молодые листья имели у С-линий в 1.64 раза большую, а у А-линий – на треть меньшую площадь в сравнении с контрольными растениями.

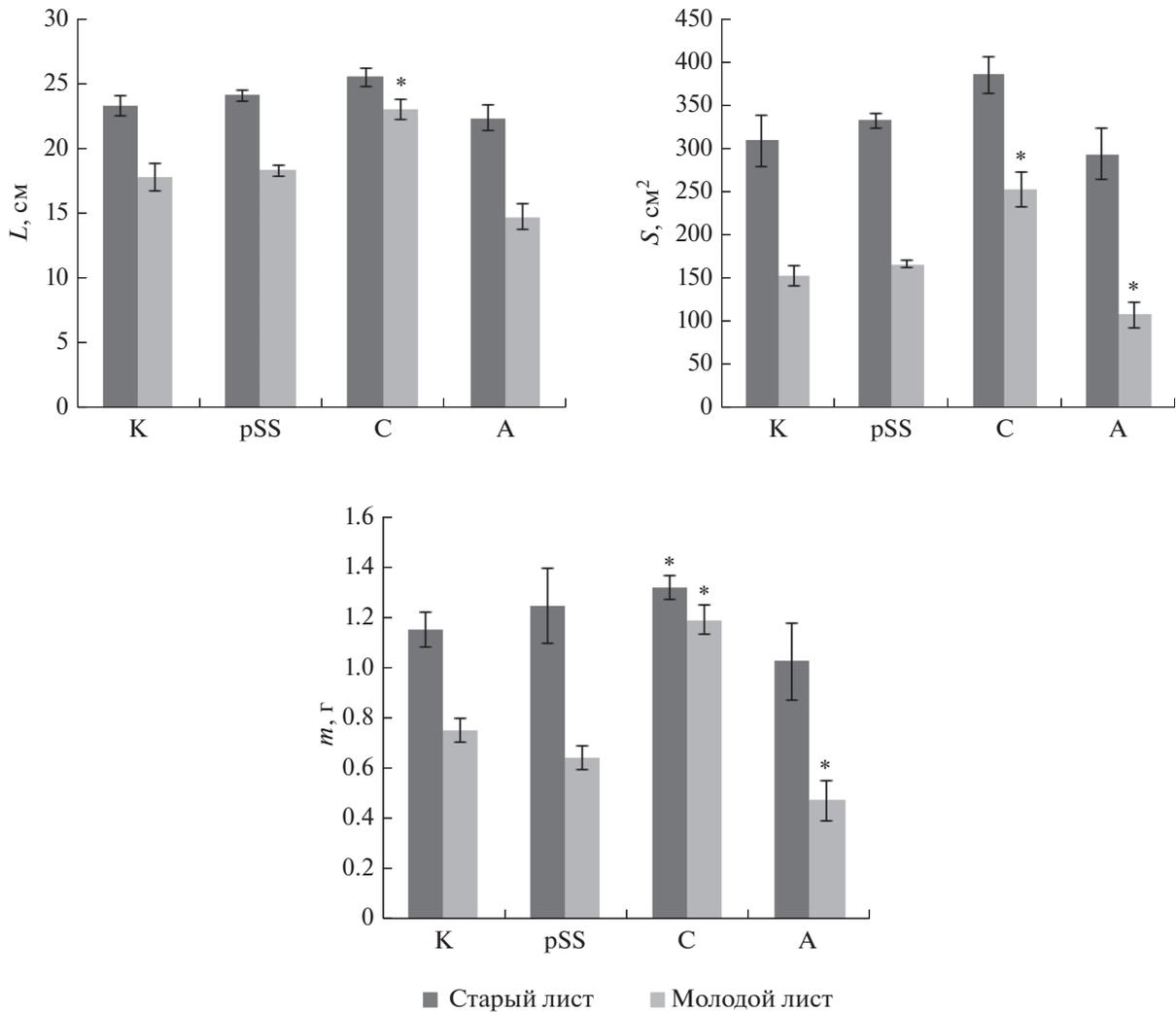
Показаны отличия в биомассе листьев трансгенных и контрольных растений. Масса более старого листа у растений со смысловой ориентацией гена *HMG1* составила 114.8% в сравнении с контролем, тогда как у антисмысловых – 89%. В молодых листьях отличия были выражены сильнее: у С-линий их масса была в 1.5 раза больше, чем у контрольных, тогда как у А-линий – почти в два раза меньше, чем в контроле (рис. 1). При этом и в контроле, и у “антисмысловых” растений верхние листья имели достоверно большую массу, чем нижние, тогда как у С-линий масса верхних и нижних листьев не отличалась.

Обнаруженные отличия могли быть вызваны неодинаковым ходом формирования листьев контрольных и трансгенных растений, в том числе, за счет изменения числа и размеров клеток мезофилла.

Показано, что подавление экспрессии гена *HMG1* достоверно не влияет на число мезофильных клеток в единице площади как в более старом, так и в более молодом листе. При этом усиление экспрессии за счет введения дополнитель-

ной копии гена приводит к уменьшению числа клеток на 16–35% в зависимости от положения листа на побеге (рис. 2). Объем клеток как палисадной ткани, так и губчатой достоверно не различался у всех изученных линий. Изменение числа клеток в единице площади листа при сохранении их объема может приводить к изменению объема всего листа и размеров внутренней ассимиляционной поверхности. Показателем внутренней ассимиляционной поверхности является индекс наружных мембран клеток (ИМК), определяемый как отношение суммарной поверхности мезофильных клеток в листе к его поверхности. Величина ИМК у нижнего листа С-линий была достоверно меньше (9.3) относительно контроля (14.2) и незначительно отличалась в А-линиях (12.0). Листья верхнего яруса не различались по данному показателю.

Другим расчетным показателем, который отражает число делений клеток в целом листе, является число мезофильных клеток в нем. В нижнем листе “смысловых” растений количество клеток было на 35% меньше, чем в нижних листьях контрольного варианта, а в “антисмысловых” линиях этот показатель достоверно не отличался. Для верхних листьев обнаружен обратный эффект: количество мезофильных клеток в листе у С-линий возросло на 38%, тогда как у А-линий отличий от контроля не наблюдали. При сравнении листьев разных ярусов в пределах одного растения обнаружено, что в контроле и у А-линий число клеток в нижних и верхних листьях различалось менее чем в два раза, тогда как у С-линий в верхнем листе кле-



**Рис. 1.** Размеры и масса листьев контрольного и трансгенного табака: длина (*L*), площадь (*S*), масса (*m*); \* – отличия от контроля достоверны при  $p < 0.05$ .

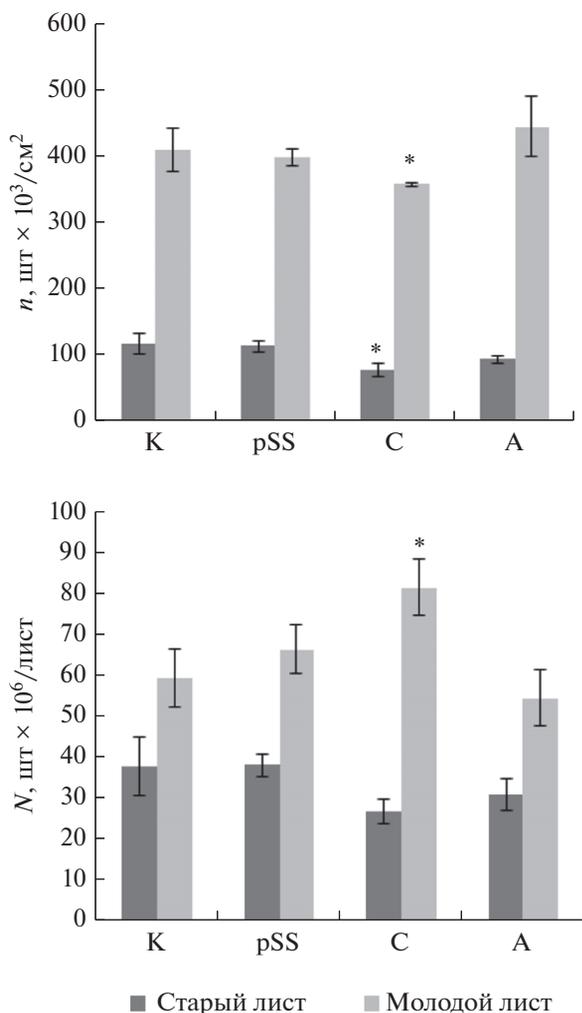
ток мезофилла было в 3.1 раза больше, чем в нижнем (рис. 2).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Сузуки с соавторами были получены мутантные линии арабидопсиса по гену *hmg1*, имеющие плейотропные фенотипы: карликовые, быстро стареющие, с мужской стерильностью (Suzuki et al., 2004). Таким образом, было показано участие данного гена в процессах роста и развития растений. Создать двойной мутант с генами *hmg1* и *hmg2*, в котором полностью был бы заблокирован ацетатно-мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов, не удалось, что доказывает важность данного метаболического пути для выживания растений (Suzuki et al., 2009). Авторы предположили, что наблюдаемые у мутантов различия связаны со снижением содержания brassinosterоидов, которые

образуются из мевалоната. Ряд исследователей описали сходные фенотипы у растений арабидопсиса, имевших нарушения в синтезе стероидов и меньшее содержание стероидных гормонов (Gachotte et al., 1995; Clouse, Feldmann, 1999).

В нашей работе у трансгенных растений табака с подавленной экспрессией гена *HMG1* мы не наблюдали карликового фенотипа, однако тенденция к снижению высоты растений была отмечена. Возможно, незначительное изменение высоты растений обусловлено недостаточной степенью подавления экспрессии гена при использовании стратегии антисмысловых РНК. Ранее мы показали, что у некоторых линий трансгенных растений с подавленной экспрессией гена *HMG1* содержание липидов и стероидов в листе уменьшалось, а у растений с дополнительной копией данного гена количество липидов в листе достоверно не отличалось, хотя было несколько больше, чем в контроле



**Рис. 2.** Число клеток мезофилла в единице площади листа ( $n$ ), число клеток в листе ( $N$ ) у контрольного и трансгенного табака, \* – отличия от контроля достоверны при  $p < 0.05$ .

(Ермошин и др., 2014). Это можно сказать и о содержании соединений неомыляемого остатка (таблица). Подобные результаты были получены другими авторами – у мутантных по гену *hmg1* растений арабидопсиса было показано уменьшение содержания тотальных стероидов (Suzuki et al., 2004); а у трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *hmg* из хомячка, не обнаружено повышенного содержания стероидов (Hey et al., 2006).

Сопоставление наших результатов с данными других авторов (Re et al., 1995; Chappel et al., 1995; Harker et al., 2003; Hey et al., 2006) показало, что вопросы роста и развития растений с измененным уровнем экспрессии гена *HMG1* изучены недостаточно: отмечены снижение всхожести семян, незначительные изменения анатомии цветка трансгенных растений и карликовый фенотип. В основном исследования были сосредоточены

на определении содержания стероидов в трансгенных линиях.

В работе В.А. Поройко с соавторами (Поройко и др., 2000) сообщалось, что растения А-линий имеют значительно меньшую высоту, чем контрольные. У полученных нами трансгенных линий растений с подавленной экспрессией гена *HMG1* значительных различий в высоте побегов не было показано. Однако, в отличие от данных В.А. Поройко с соавторами (2000), мы наблюдали тенденцию к увеличению высоты растений С-линий в сравнении с контролем и достоверное увеличение их высоты в сравнении с “антисмысловыми”. Можно предположить, что различия в результатах обусловлены иными условиями выращивания растений в экспериментах В.А. Поройко.

Изучение мезоструктуры листа трансгенных растений табака с геном *HMG1* в различных ориентациях по отношению к промотору проведено впервые. Любопытным оказался факт, что трансгенные растения с дополнительной копией гена имели меньшее число клеток в единице площади листа. Мы предположили, что введение данного гена может положительно сказаться на содержании brassinosteroidов и цитокининов. Это могло бы привести к увеличению площади листа и росту числа мезофильных клеток в нем. Площадь листа действительно была больше у “смысловых” растений, однако число клеток и их объем при этом не увеличивались в сравнении с контролем. Этот факт дает основание предположить, что у растений С-линий клетки листа должны быть расположены более рыхло, чем в контроле и А-линиях. Другое объяснение может быть связано с тем, что в листе “смысловых” линий может быть лучше развита механическая и проводящая ткань, за развитие которой отвечают, в том числе, brassinosteroidы (Хрипач и др., 1993).

В более молодых листьях, расположенных в верхней части побега, у трансгенных растений С-линий в сравнении с контрольными отмечено увеличение количества клеток в целом листе, следовательно, в процессе развития листа число делений клеток было больше в верхних листьях “смысловых” линий. Это может быть связано с предположительно большим содержанием изопреноидных фитогормонов в растениях с усиленной экспрессией изучаемого гена. Однако в более старых листьях число делений в листе “смысловых” растений было достоверно меньше, чем у контрольного варианта. Возможно, это обусловлено тем, что в листьях разного яруса неодинаково соотношение цитокининов (и/или brassinosteroidов) к ауксинам, которые образуются в апикальных меристемах и транспортируются базипетально. При закладке примордия листа расстояние до точки роста, продуцирующей ауксины, одинаково для зачатков листа разного яруса,

однако во время роста побега расстояние от формирующегося в нижней части листа до точки роста становится больше, чем это же расстояние для листа в верхней части побега. Следовательно, с возрастом должен усиливаться градиент ИУК вдоль побега (Медведев, 2012). Кроме того, более молодые листья, закладывающиеся в верхней части побега, во время формирования получают больше фотоассимилятов, т.к. питаются от большего числа листьев-доноров. Для листа махорки и табака показан продолжительный период роста делением клеток, который может идти параллельно с ростом растяжением практически до окончания увеличения площади листа (Avery, 1933; Некрасова, 1978). Поэтому соотношение фитогормонов в листе табака в течение всего периода роста может меняться, что может сказаться на частоте клеточных делений или скорости растяжения клеток.

Различия в размерах внутренней ассимиляционной поверхности (ИМК) и плотности упаковки мезофилла являются факторами, определяющими внутрилиственные составляющие сопротивления диффузии CO<sub>2</sub> (Лайск и др., 1970; Evans, Caemmerer, 1996) и, следовательно, скорость ассимиляции углекислоты в листе. Скорость фотосинтеза наряду с дыханием и транспортом ассимилятов определяет ход продукционного процесса растений, в том числе, скорость роста, размеры и массу вегетативных и генеративных органов.

Ранее мы показали, что у трансгенных растений в сравнении с контрольными имеются изменения в генеративной сфере, а именно, возрастание доли стерильной пыльцы и частоты встречаемости патологических семян (Ermoshin et al., 2011, Ермошин, 2012). Эти данные согласуются с результатами других исследований, показавших, что ген *HMG1* вовлечен в формирование генеративной сферы растений (Suzuki et al., 2004).

Таким образом, в нашей работе показано опосредованное участие генов семейства *HMG* в процессах роста и развития растений табака. Как введение дополнительной копии исследуемого гена, так и подавление его экспрессии за счет стратегии антисмысловых РНК приводило к изменению структуры фототрофных тканей листа, и к изменению плотности упаковки мезофильных клеток в листе. Эффект зависел от положения листа на побеге, что, возможно, связано с градиентом содержания фитогормонов вдоль побега растения. Наблюдаемые различия также могут быть связаны с изменением содержания стероидов в мембранах клеток трансгенных растений или количеством brassinosteroidов в тканях и органах.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки России (Программа повышения конкурентоспо-

собности Уральского федерального университета) и гранта РФФИ (№ 15-04-08380).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ермошин А.А. Развитие женского гаметофита у трансгенных растений с экспрессией гетерологического гена *HMG1* // Биология будущего – традиции и новации: материалы 2 Всерос. конф. Екатеринбург: УрФУ, 2012. С. 199–202.
- Ермошин А.А., Санаева Ю.В., Борцова С.А., Киселева И.С. Ген *HMG1* влияет на накопление липидов в листьях растений табака // Трансгенные растения: технология создания, биологические свойства, применение: материалы V Всерос. симпозиума, Москва: ИФР РАН, 2014. С. 94–97.
- Кандюк Р.П. Методы определения стероидов в морских объектах // Экология моря. 2002. Т. 59. С. 87–90.
- Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Влияние эктопической экспрессии гена *NtEXPA5* на размеры клеток и рост органов трансгенных растений табака // Онтогенез. 2013. Т. 44. № 1. С. 34–41.
- Лайск А., Оя В., Рахи М. Диффузное сопротивление листьев в связи с их анатомией // Физиология растений. 1970. Т. 17. № 1. С. 40–48.
- Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Шадрин Т.Е., Булатова И.В., Абрамочкин Д.Г., Мирошников А.И. Контрансформация осины и березы тремя областями Т-ДНК, находящимися на двух различных репликациях в одном штамме *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. 2010. Т. 46. С. 1458–1466.
- Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 4. С. 543–556.
- Мокронос А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции ВНИИ растениеводства. 1978. Т. 61. С. 119.
- Мокронос А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. С. 196.
- Некрасова Г.Ф. Формирование структуры и фотосинтетической функции в процессе роста листа / Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата. Свердловск: Изд-во УрГУ, 1978. С. 61–73.
- Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена *hmg1* // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.
- Хрипач В.А., Жабинский В.Н., Лахвич Ф.А. Брассиностероиды. Минск: Наука и техника, 1993. С. 287.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.
- Avery G.S. Structure and development of the tobacco leaf // American Journal of Botany. 1933. V. 20. P. 565–592.
- Bach T.J. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? // Lipids. 1986. V. 21. P. 82–88.

- Chappel J., Wolf F., Proulx J. et al. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1337–1343.
- Clouse S.D. Plant development: A role for sterols in embryogenesis // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 601–604.
- Edwards K., Johnstone C., Thomson C.A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1349.
- Evans J.R., von Caemmerer S. Carbon dioxide diffusion inside leaves // *Plant Physiol.* 1996. V. 110. P. 339–346.
- Ermoshin A.A., Alekseeva V.V., Rukavtsova E.B., Zimnitskaya S.A., Kiselyova I.S., Buryanov Ya.I. Suppression of isoprenoid synthesis affects the generative function of transgenic plants // *Acta Biochimica Polonica.* 2011. V. 58. Sup. 4. P. 89.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497–509.
- Gachotte D., Meens R., Benveniste P. An Arabidopsis mutant deficient in sterol biosynthesis: heterologous complementation by ERG3 encoding a D7-C-5-desaturase from yeast // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 407–416.
- Harker M., Holmberg N., Clayton J.C. et al. Enhancement of seed phytosterol levels by expression of an N-terminal truncated *Hevea brasiliensis* (rubber tree) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase // *Plant Biotechnol. J.* 2003. V. 1. P. 113–121.
- Hey S.J., Powers S.J., Beale M.H. et al. Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase // *Plant Biotechnol. J.* 2006. V. 4. P. 219–229.
- Mano Y., Nemoto K. The pathway of auxin biosynthesis in plants // *Journal of Experimental Botany.* 2012. V. 63. P. 2853–2872.
- Schaller H. The role of sterols in plant growth and development // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. № 3. P. 163–175.
- Re E.B., Jones D., Learned R.M. Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG-CoA reductase expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1995. V. 7. P. 771–784.
- Suzuki M., Kamide Y., Nagata N. et al. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 750–761.
- Suzuki M., Nakagawa S., Kobayashi K. et al. Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 2055–2064.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 28. P. 26405–26410.

## Morphological Features of the Transgenic Tobacco Plant Sprout Expressing the 3-oxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (*Hmg1*) Gene in the Direct and Reverse Orientations with Regard to the Promotor

A. A. Ermoshin<sup>a</sup>, I. S. Kiseleva<sup>a</sup>, S. A. Bortsova<sup>a</sup>, Y. V. Sanaeva<sup>a</sup>, and V. V. Alexeeva<sup>b</sup>

<sup>1</sup>Yeltsin Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russia

<sup>2</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia

e-mail: bos\_o@mail.ru

Received August 3, 2015; in final form, February 3, 2016

3-oxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG1) catalyzes the formation of mevalonic acid, the key intermediate of the cytosolic isoprenoid synthesis pathway. The parameters of stem and leaf growth were studied in the transgenic tobacco plants that express the HMG1 gene in both sense and antisense directions with respect to the constitutive promoter. The transgenic plant height did not significantly differ from that of the control plants, though the plants carrying the sense copy of the HMG1 gene were considerably taller than plants that carried the antisense gene copy. Plants carrying an extra copy of the HMG1 gene were also characterized by increased leaf area. The number of mesophyll cells calculated per square unit of transgenic plants leaves was smaller than in the control plant leaves, though their volume was not considerably changed in any of the variants, suggesting changes in the cell folding density in leaves.

**Keywords:** transgenic tobacco plants, *HMG1* gene, sprout height, leaf area, mesophyll