

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

НАУКОВІ, ПРИКЛАДНІ ТА ОСВІТНІ АСПЕКТИ ФІЗІОЛОГІЇ, ГЕНЕТИКИ, БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН І МІКРООРГАНІЗМІВ

МАТЕРІАЛИ XII КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ ВЧЕНИХ

15-16 листопада 2012 р.

Київ
2012

Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: Матеріали XII конференції молодих вчених (Київ, 15-16 листопада, 2012 р.). - Київ, 2012. - 328с.

Представлено праці молодих вчених, в яких відображено результати фундаментальних і прикладних досліджень із основних напрямків фізіології, генетики та біотехнології рослин і мікроорганізмів.

Для фізіологів рослин, біохіміків, генетиків, мікробіологів, спеціалістів сільського господарства, а також викладачів, аспірантів і студентів вищих навчальних закладів.

Організатор: Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

ОРГАНІЗАЦІЙНИЙ КОМІТЕТ:

Голова: Герой України, академік НАН України В.В. Моргун
Заступники голови: д.б.н., проф. С.Я. Коць
чл.:кор. НАН України В.В. Швартау
Секретар: к.б.н. М.П. Радченко
Члени оргкомітету: к.б.н. В.М. Починок
к.б.н. А.В. Бавол
к.б.н. Л.М. Михалків
к.б.н. П.М. Маменко
к.б.н. Л.Л. Оксьом
к.б.н. Т.А. Казанцев

Затверджено до друку вченою радою Інституту фізіології рослин і генетики НАН України

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ ОРХИДЕИ *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHN. F., ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН $\Delta 9$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ

Т.Н. Кирпа¹, В.А. Рудас¹, О.А. Овчаренко¹, А.А. Клебанович¹ И.М. Герасименко¹, Р.В. Иванников², Ю.В. Шелудько¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина; E-mail: ysheludko@ukr.net

²Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины, ул. Тимирязевская 1, г. Киев, 01014, Украина

Одним из важных факторов, определяющим устойчивость растительной клетки к температурному и осмотическому стрессам, является жирнокислотный состав клеточной мембраны. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран у растений определяет их способность адаптироваться к низким температурам. [1]. Гетерологическая экспрессия генов десатураз жирных кислот, которые катализируют образование двойных связей в углеводородных цепочках, позволяет изменить спектр жирных кислот мембранных липидов и повысить холодоустойчивость растений. У высших растений синтез ненасыщенных С-16 и С-18 жирных кислот начинается с введения двойной связи в позиции $\Delta 9$ и локализуется в пластидах. Последующие реакции десатурации могут происходить или в пластидах, или в эндоплазматическом ретикулуме [2]. Поэтому биосинтез мононенасыщенных жирных кислот играет ключевую роль в изменении спектра мембранных липидов, обеспечивая субстрат для дальнейшей десатурации, и, таким образом, повышая устойчивость клеток к холодовому стрессу. С целью изучения механизмов холодовой адаптации и получения холодостойких растений нами была проведена генетическая трансформация *Dendrobium linguella* – популярного для оранжерейного и комнатного выращивания вида, относящегося к семейству орхидных (Orchidaceae), геном ацил-липидной десатуразы *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus*. Слияние гена десатуразы в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum* (*licBM3*) позволило отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевого гена. Гибридный ген *desC::licBM3* под контролем 35S промотора ВМЦК был клонирован в бинарный вектор для агробактериальной трансформации рNPB14.

Dendrobium linguella в естественных условиях встречается в низменных и подгорных районах на высоте от 300 до 1250 метров в странах южной Азии. В качестве исходного материала для генетической трансформации использовали асептические вторичные протокормы *D. linguella* линии 534 (13) из коллекции Национального ботанического сада им. Н. Н. Гришко НАН Украины. Для генетической трансформации использовали методику Horsch et al. [3] с некоторыми модификациями: вторичные протокормы *D. linguella* переносили в пустые чашки Петри, разрезали их на сегменты 0,3-0,5 см и оставляли на свету. Через 7-10 суток сегменты смачивали разбавленной в 3 раза 10 mM $MgSO_4$ суспензией *A. tumefaciens* GV3101 рNPB14, активированной ацетосирингоном (200 мкМ). Сегменты вместе с агробактериальной суспензией помещали в вакуумную камеру (0,2 атм). Через 10-15 мин. сегменты подсушивали и оставляли на 7-10 суток в условиях рассенного освещения. Всего было обработано около 4000 сегментов. Потом сегменты переносили на модифицированную питательную среду OrgR, содержащую макросоли ST [4], микросоли и Fe-хелат MS [5], витамины по Гамборгу [6], 20 г/л сахарозы, 50 мг/л гумата натрия, 200 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л морфолиноэтансульфоновой кислоты, 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и дополненную 500-600 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Через 2-3 недели культивирования растительные ткани пере-

носили на питательную среду того же состава, дополненную 5 мг/л фосфинотрицина для селекции трансгенных линий. В дальнейшем растительные ткани пассировали каждые 3 недели на этой же среде, но вместо фосфинотрицина добавляли гербицид BASTA в концентрации 5-10 мг/л. В процессе культивирования постоянно отбирали зеленые трансгенные линии. Через 6-7 месяцев культивирования было отобрано около 500 трансформированных клонов (Рис.1). После трансформации был проведен генетический анализ первых 10 клонов потенциально трансгенных растений и исследована экспрессия трансгена методом качественного лихеназного теста. Для проведения генетического анализа был использован метод мультиплексной ПЦР с четырьмя парами праймеров, позволяющий в ходе одной реакции определить присутствие целевых генов (десатуразы и термостабильной лихеназы), подтвердить качество изолированной для анализа ДНК и отсутствие агробактериальной контаминации. Также была оценена активность термостабильной лихеназы в экстрактах белков трансгенных линий. В результате были отобраны растения, несущие вышеупомянутые трансгены и демонстрировавшие активность термостабильной лихеназы. Дальнейшая работа предполагает исследование спектра жирных кислот и проведение физиолого-биохимического анализа полученных трансгенных растений с целью оценки их холодостойкости.

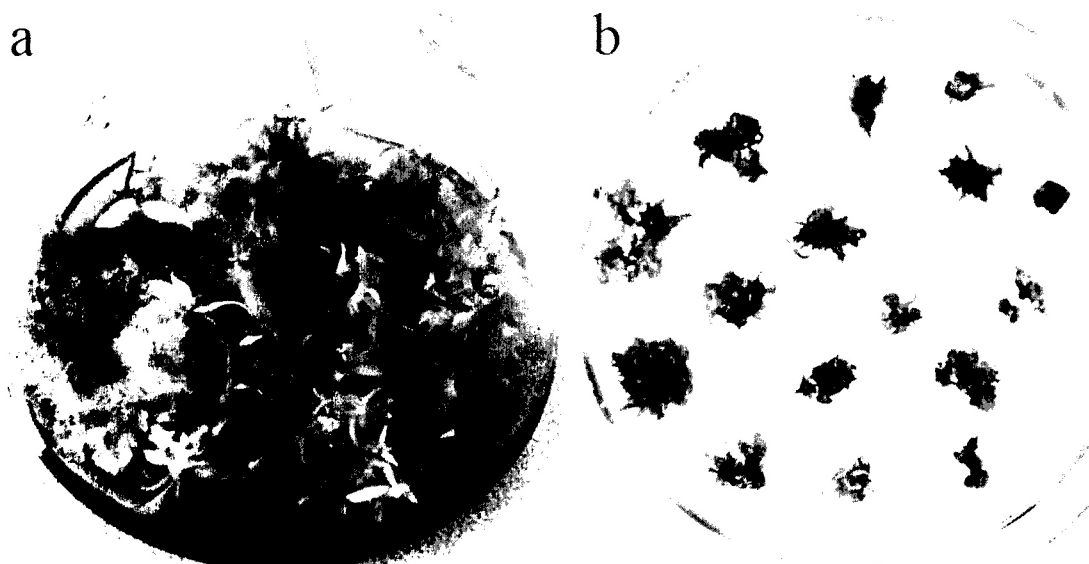


Рис. 1. Вторичные протокоормы (а) и регенерация потенциально трансгенных растений *D. linguella* на селективной среде после генетической трансформации *A. tumefaciens* GV3101 pNPB14 (b).

Литература

1. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // *FEBS Letters*– 2006 – 580:5477–5483.
2. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // *Успехи биологической химии* – 2001 – 41:163-198.
3. Horsch R.B., Fry J., Hoffmann N., Eicholtz D., Rogers S., Fraley R. A simple and general method for transferring genes into plants// *Science* - 1985 - 227:1229-1231.
4. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration // *Plant Physiol* – 1977 – 60:313-116.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol Plant* – 1962 – 15:473-497.
6. Gamborg O.L., Miller L.A., Ojima K. Nutrient requiments of suspension cultures of soybean root cells // *Exp Cell Res* – 1968 – 50:151-158.

**ЭКСПРЕССИЯ В *NICOTIANA TABACUM* ГЕНОВ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ
ДЕСАТУРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ БЕЗ СИГНАЛОВ ТРАНСПОРТА В
ХЛОРОПЛАСТЫ**

**Т.Н. Кирпа¹, И.М. Герасименко¹, Л.А. Сахно¹, В.В. Клочко², А.Н. Остапчук²,
И.В. Голденкова-Павлова³, Ю.В. Шелудько¹**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: ysheludko@ukr.net

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного 152, г. Киев, 03680, Украина

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина 3, г. Москва, 119991, Россия

Изучение механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды и создание новых устойчивых форм методами генетической инженерии является актуальной задачей современной биотехнологии в условиях риска мирового дефицита продовольствия, сокращения пригодных для сельского хозяйства площадей и глобальных климатических изменений. Одним из важных факторов, определяющим устойчивость растительной клетки к температурному и осмотическому стрессам, является жирнокислотный состав клеточной мембраны. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран, обеспечивающее необходимую текучесть мембран при пониженных температурах, коррелирует с холодоустойчивостью растений [1]. Катализируют реакции введения двойных связей десатуразы жирных кислот. Считается, что у высших растений синтез насыщенных или мононенасыщенных жирных кислот (с двойной связью в позиции Δ9) происходит в пластидах. Дальнейшая десатурация может происходить или в пластидах, или в эндоплазматическом ретикулуме [2]. Тем не менее, существуют сообщения о клонировании генов, кодирующих Δ9-ацил-липидные десатуразы предположительно непластидной локализации, хотя четкие данные об их участии в биосинтезе мононенасыщенной олеиновой кислоты не приведены [2]. Ответ на вопрос о возможности формирования олеиновой кислоты вне хлоропластов, и, соответственно, изменении спектра жирных кислот мембранных липидов могла бы дать эффективная гетерологическая экспрессия гена ацил-липидной десатуразы цианобактериального происхождения без сигнала транспорта в хлоропласты.

Нами был сконструирован ряд генетических экспрессионных векторов, несущих гены ацил-липидных десатураз *desC* (Δ9) *Synechococcus vulcanus* и *desA* (Δ12) *Synechocystis* sp. PCC 6803, слитые с репортерным геном термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum* [3] *licBM3* под контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК. Проведена генетическая трансформация модельного объекта *Nicotiana tabacum* и доказано присутствие трансгена в полученных растениях. Анализ активности термостабильной лихеназы позволил отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевых генов [4]. Растения табака двух линий, экспрессирующие гибридный ген *desA::licBM3*, были повторно трансформированы векторной конструкцией, несущей нативный ген *desC* под контролем 35S промотора ВМЦК. После селекции на среде с фосфинотрицином были отобраны растения, у которых было показано присутствие и экспрессия обоих генов десатураз.

Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии анализировали соотношение жирных кислот в экстрактах липидов клеточных мембран трансгенных растений табака. Сравнивались спектры жирных кислот контрольных растений (нетрансгенные растения табака и растения табака, несущие ген β-глюкуронидазы), растений, трансформированных десатуразой *desC::licBM3* (Δ9), *desA::licBM3* (Δ12) и двойных трансформантов, экспрес-

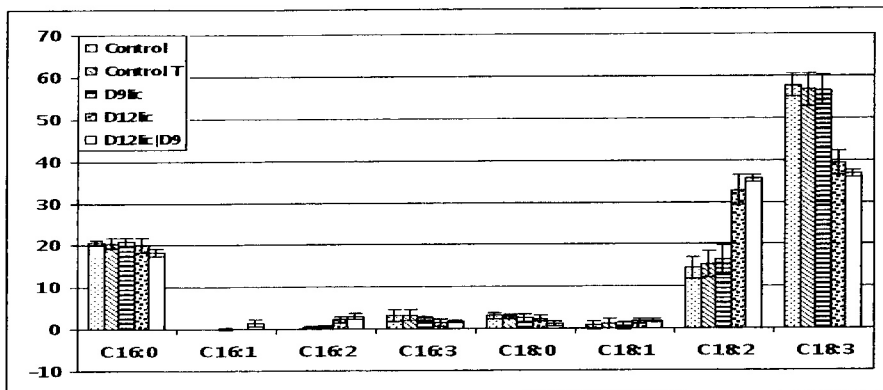


Рис 1. Соотношение жирных кислот в мембранах трансгенных линий *N. tabacum*. В качестве контроля использованы нетрансгенные растения табака и растения табака, несущие ген β -глюкуронидазы.

сирующих оба гена. Соотношение жирных кислот не отличалось в контрольных линиях и линиях, экспрессирующих ген десатуразы *desC::licBM3* ($\Delta 9$) без сигнала транспорта в хлоропласты, что свидетельствует об отсутствии соответствующего субстрата и/или переносчика электронов для данной десатуразы вне хлоропластов. Значительные отличия от контроля наблюдали у растений, содержащих ген *desA-licBM3* и у двойных трансформантов, которые содержали гены *desA-licBM3* и *desC* (Рис. 1). Соотношение ненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах растений данных линий было смещено в сторону накопления двуненасыщенных C16 и C18 молекул с одновременным уменьшением содержания триненасыщенных жирных кислот. Очевидно, что данные изменения обусловлены активностью гибридной десатуразы $\Delta 12$ предположительно в ЭР.

Для оценки устойчивости растений к холоду определяли уровень активности фермента супероксиддисмутазы (СОД), отвечающего за инактивацию продуктов окислительного повреждения клетки. При охлаждении обнаружено увеличение активности СОД во всех линиях трансгенных растений, экспрессирующих гены десатураз, тогда как в контрольных линиях наблюдали ингибирование СОД.

Таким образом, проведена генетическая трансформация *Nicotiana tabacum* генами ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803, слитыми с репортерным геном термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum*, и доказаны присутствие и экспрессия трансгенов в полученных растениях. Изменения спектра жирных кислот мембранных липидов в сторону накопления двуненасыщенной линолевой кислоты наблюдали в линиях, экспрессирующих ген *desA-licBM3*. Во всех линиях трансгенных растений обнаружено увеличение активности СОД, свидетельствующее о повышенной устойчивости к холодovому стрессу.

Работа выполняется при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006062.

Литература

1. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters – 2006 – 580:5477–5483.
2. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии – 2001 – 41:163–198.
3. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирюзян Э.С. Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы *Clostridium thermocellum*, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов // Молекулярная биология – 2002 – 36(4):868–876.
4. Герасименко И. М., Головач И. С., Кищенко Е. М., Сахно Л. А., Синдаровская Я. Р., Шимшилашвили Х. Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение и анализ трансгенных растений, несущих гены 9 и 12 десатураз цианобактерий. // Информационный вестник ВОГиС. – 2010 – 14(1):127–133.