

Micromycetes strains were selected: *Fusarium sambucinum* – nicotinic acid producer and its derivatives, *Penicillium sclerotiorum* - β -carotene and protein. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical property was developed using joint cultivation of selected strains. This approach has allowed reduce the terms of fermentation and augment the output of biologically active substances. The test of fungal preparation which had high content of vitamins, coenzymes and other biologically active substances proves the possibility of its using as food and chow additives.

**ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р¹, ЮРЬЕВА Н.О², БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н.¹,
ГОРДУКОВА М.А.¹, ЦЫДЕНДАМБАЕВ В.Д.², НОСОВ А.М.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.¹**

¹*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).*

Россия, Москва, ул. Губкина 3. 119991

e-mail: chris@vigg.ru

²*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН (ИФР РАН)*

Россия, Москва, ул. Ботаническая 35. 127276

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ, ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Известно, что одной из первичных ролей в способности растений к перенесению холода отводится мембранным липидам. Молекулы липидов в мембране образуют двойной слой, в котором гидрофобные концы жирных кислот обращены друг к другу, а гидрофильные головки образуют заряженный слой на поверхности мембран. При нормальной температуре и оптимальном осмотическом давлении мембрана представляет собой жидко кристаллическую структуру, обладающую определенной степенью текучести. Термин «текучесть» используется для описания степени неупорядоченности и физической подвижности внутри липидного бислоя мембран. При снижении температуры или гипертоническом шоке, молекулы жирных кислот приближаются друг к другу. По сути, это означает сжатие мембраны и уменьшение ее текучести. При определенных условиях может наступить критический момент, когда большая часть липидов потеряет свою подвижность настолько, что произойдет фазовый переход из жидко-кристаллического состояния в состояние геля. Это приведет к гибели клетки, если она будет не в состоянии поддерживать свои мембраны на определенном уровне текучести. Главными причинами смертельного исхода являются уменьшение подвижности белков в липидном бислое, их неспособность к изменению конформации и как следствие - полная потеря своих функций. При отклонении температуры от нормальной в сторону ее повышения либо при гипотоническом шоке, мембраны растягиваются, то есть возрастает подвижность липидных молекул в бислое и текучесть мембран увеличивается. Этот процесс может привести к разделению липидной фазы и полному разрушению мембранных структур. Обычно клетки обладают защитными системами для контроля над состоянием своих мембран и в момент изменения условий среды активируют эти системы. Так при снижении температуры активируется синтез десатураз. Десатуразы – это ферменты, которые вводят двойные связи в молекулы жирных кислот, и характеризуются высокой субстратной специфичностью. Следует отметить, что в ряде работ говорится о ключевой роли ненасыщенных ЖК в ответных реакциях растений не только на изменение температуры, но и на атаки фитопатогенов. В тоже время роль десатураз в механизмах адаптации биологических мембран и растений в целом до

конца не выяснена. Это связано, прежде всего, с методическими трудностями анализа экспрессии генов в высших растениях и со значительно более сложными механизмами регуляции в эукариотических системах. В связи с этим, важно разработать адекватные модели для изучения физиологической роли десатураз в жизнедеятельности растений, в том числе выяснения вклада ненасыщенности жирных кислот в мембранных липидах в механизмах устойчивости растений к стрессовым факторам. Такими моделями могут быть трансгенные растения, экспрессирующие гетерологичные гены, кодирующие десатуразы с различной субстратной специфичностью.

Материалы и методы

В работе использовались: штамм *Escherichia coli* BL21, агробактерии, растения картофеля сорта «Десница», «Юбилей Жукова».

Результаты и обсуждения

Были сконструированы экспрессионные растительные вектора, несущие в своем составе нативные и гибридные гены десатураз.

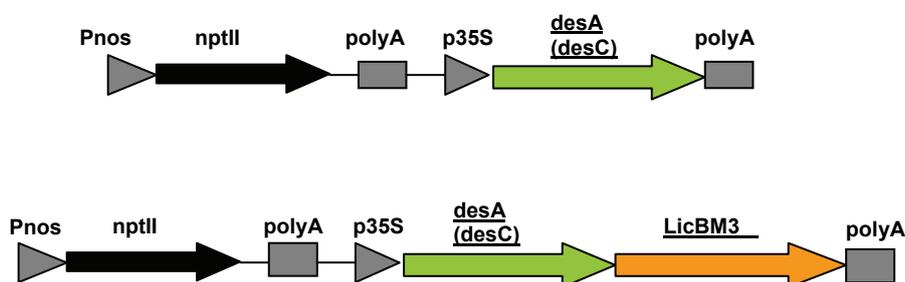


Рисунок 1. Pnos- промотор нопалинсинтазы, nptII - ген устойчивости к канамицину, polyA - полиА последовательность, p35S- промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, desA, desC- гены $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -десатуразы, соответственно LicBM3 - репортерный ген, кодирующий лихеназу.

Далее была проведена агробактериальная трансформация растений картофеля. Выбор этих растений для создания моделей основан на том, что, во-первых, растения картофеля относятся к достаточно холодостойким растениям и могут переносить кратковременное понижение температуры до -4°C , что облегчит проведение экспериментов по определению холодоустойчивости трансформантов растений, а также по устойчивости растений к фитопатогенам. Далее, на селективном агенте были отобраны первичные трансформанты и проведен их молекулярно-генетический анализ. В настоящее время проанализированы трансформанты линий с нативным и гибридным геном $\Delta 12$ -десатуразы.

С использованием системы праймеров, их концентраций и условий ПЦР, разработанных нами, проведена мультиклексная ПЦР, результаты которой показали наличие последовательностей селективного и целевых генов, а также регуляторных элементов в геномной ДНК трансформантов.

Для того, чтобы показать, что в полученных трансформантах картофеля происходит образование белковых продуктов, белковые лизаты, полученные из независимых трансформантов растений, были проанализированы методом энзимограмм. Полученные результаты показали, что в отобранных трансформантах происходит образование гибридных белков с молекулярной массой соответствующей теоретически рассчитанной. Эти результаты позволили нам включить отобранные трансформанты в дальнейшие эксперименты.

Далее был проведен сравнительный анализ по определению ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидов в контрольных растениях и различных линиях трансформантов. Было показано, что экспрессия гетерологичной десатуразы

приводит к достоверному увеличению как диеновых, так и триеновых жирных кислот в мембранных липидах трансформантов.

Для того, чтобы выяснить взаимосвязь между изменением в уровне ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов трансформантов картофеля и их устойчивостью к низким температурам был проведен их физиолого-биохимический анализ. Для этих целей мы использовали стандартные методы определения степени холодостойкости растений:

1. Метод определения интенсивности перекисного окисления липидов, определяемого по накоплению в листьях продукта этого процесса – малонового диальдегида (МДА) до охлаждения и после холодной экспозиции у контрольных растений и трансформантов. Было показано, что в результате Холодовой экспозиции содержание МДА в тканях контрольных растений возрастает, тогда у трансформантов этот показатель достоверно не изменяется. Это свидетельствует о более высокой устойчивости трансгенных линий к низкотемпературному стрессу. В отношении исследуемых трансформантов картофеля следует отметить, что во всех линиях трансформантов даже до охлаждения уровень МДА был почти в 1,5 раза ниже, чем у контрольных растений (рис. 2).

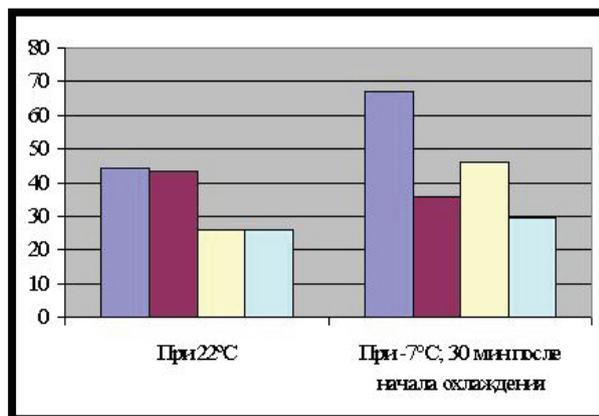


Рисунок 2. Определение интенсивности перекисного окисления липидов по МДА. Контрольные растения - линия W, Трансформанты DesA-LicBM3 - линии C1-3

2. Метод определения индекса повреждения листьев – это показатель электропроводности водных экстрактов полученных в результате экзосмоса электролитов из тканей листьев при холодной экспозиции при -7°C и после нее. Он позволяет регистрировать скорость утечки ионов калия и натрия. Показано, что через час после 30-минутной инкубации при -7°C индекс повреждения листьев исходного сорта значительно увеличился, в то время как у растительных трансформантов он остался практически без изменений (рис. 3).

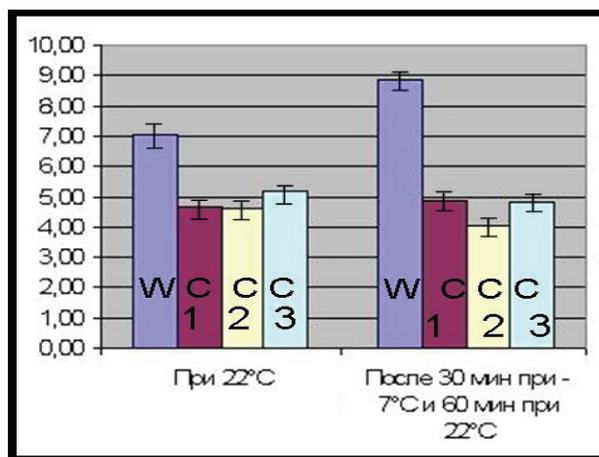


Рисунок 3 Определение Индекс повреждения листьев трансформированных линий картофеля в норме и после охлаждения. Контрольные растения - линия W, Трансформанты DesA-LicBM3 - линии C 1-3.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гетерологичной десатуразы в растениях картофеля приводит к увеличению количества ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов, что коррелирует с более высокой устойчивостью трансформантов картофеля к низким температурам.

Полученные результаты свидетельствуют и о том, что в трансформантах растений изменены физические свойства мембраны. Это позволило сделать нам следующее предположение: изменение физических свойств мембран в трансформантах растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот) может модулировать конформацию и/или активность интегрированных в мембранные липиды белковых комплексов, большинство из которых являются либо рецепторами, либо сенсорами, участвующими в передаче сигналов при действии стрессовых факторов. В частности, сенсоры, которые участвуют в запуске защитных механизмов у растений в ответ на атаку фитопатогенов.

Для косвенного подтверждения этого предположения были проведены следующие эксперименты.

Была проведена инокуляция листьев растений картофеля суспензией зооспор гриба *Phytophthora infestans*. В качестве стандартов использовали растения сорта: Никулинский - с высокой устойчивостью к патогену, Десница – со средней устойчивостью и Жуковский ранний - восприимчивый сорт. Отмечалась задержка в появлении симптомов поражения у трансформантов картофеля по сравнению с растениями исходного сорта и сортов-стандартов.

Далее, мы провели предварительную оценку трансформантов картофеля, экспрессирующих гибридный ген десатуразы, на устойчивость к возбудителю бактериального рака картофеля. На листьях трансформантов картофеля отмечено отсутствие симптомов этого заболевания, по сравнению с исходным сортом.

Сравнение показателей устойчивости трансформантов картофеля к ряду фитопатогенов с показателями устойчивости либо исходного сорта, либо сортов-стандартов подтверждают, что трансформанты картофеля, экспрессирующие ген Δ-12-десатуразы, могут быть потенциально устойчивыми к возбудителю фитофтороза и бактериального рака.

Молекулярные механизмы такой устойчивости могут быть в дальнейшем изучены на сконструированных нами моделях. В настоящее время, можно только предположить, что изменение физических свойств мембран в трансформантах

растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот) может модулировать конформацию белков-сенсоров, участвующих в передаче сигналов при действии стрессовых факторов, и, как следствие, приводит к активации защитной системы растений.

Резюме

Были сконструированы гибридные гены *desA-licBM3* и *desC-licBM3*. Эти гены были клонированы в растительные экспрессионные вектора, которыми далее были трансформированы растения картофеля *Solanum tuberosum*. Показано, что гибридные гены экспрессируются в растительных трансформантах и при этом десатуразы и лихеназа сохраняют свои основные свойства. Продемонстрировано, что экспрессия гетерологичных десатураз в растениях приводит к увеличению ненасыщенных жирных кислот, что коррелирует с более высокой толерантностью растений к воздействию стрессовых факторов.

Hybrid genes *desA-licBM3* and *desC-licBM3* were constructed. These hybrid genes were cloned in plant expression vectors and were introduced into *Solanum tuberosum*. It was shown that hybrid genes expressed in transgenic plants and desaturases and lichenase save their main behaviors consisting hybrid genes. It was demonstrated that expression of heterological desaturases into plants led to increase unsaturated fat acids and this correlate with high level of plant tolerance to set stress factors.

ЯЦИШИН В.Ю., ФЕДОРОВИЧ Д.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: yatsyshyn.v@gmail.com

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ СИНТЕЗУ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*

Флавінові кофактори: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) є похідними рибофлавіну (РФ) та задіяні у багатьох реакціях, необхідних для основних метаболічних процесів (аеробне та анаеробне дихання, фотосинтез, денітрифікація, репарація ДНК, біолюмінесценція). Флавопротеїни залучені в метаболізм вуглеводів, ліпідів, білків, синтез вітамінів В₆ та В₁₂, а також у метаболізм заліза. Препарати флавінових нуклеотидів мають медичне значення і використовуються як реагенти у біохімії.

Відомо багато мікроорганізмів, здатних до надсинтезу попередника флавінових нуклеотидів – РФ, але досі не описано жодного природного надсинтетика ФМН чи ФАД. Лише мутанти гриба *Emmenthosium ashbyii* здатні продукувати деякі кількості ФАД у суміші з РФ. Нами було вперше сконструйовано рекомбінантні штами флавіногенних дріжджів *Candida famata* з надекспресованим геном *FMN1* (кодує РФ-кіназу – фермент, який каталізує фосфорилування РФ до ФМН), здатні до надсинтезу ФМН [2], що продукували в 1000 разів більше цього нуклеотиду, ніж штам дикого типу. Як відомо [8], одним із ефективних способів підвищення продуктивності процесу надсинтезу бажаних метаболітів є, окрім методів генетичної інженерії, підбір оптимального складу середовища культивування та умов ферментації.

У роботі наведено дані про вплив різних факторів на процес біосинтезу ФМН отриманими нами рекомбінантними штамами *C. famata* з надекспресованим геном *FMN1* за умов інкубації визначеної кількості клітин. Підібрано оптимальне джерело і концентрацію вуглецю (сахароза) та азоту (сечовина). Встановлено, що оптимальною для нагромадження ФМН є 24 годинна інкубація.