УДК 581.1

КИРПА-НЕСМІЯН Т.М. [1], ГЕРАСИМЕНКО І.М. [1], САХНО Л.О. [1], ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА І.В. [2], ШЕЛУДЬКО Ю.В. [1]

[1] Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного 148, e-mail: t-kirpa@ukr.net

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, г.Москва, ул. Ботаническая, 35

ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЧНОГО СТРЕСУ НА РОСЛИНИ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГІБРИДНІ ГЕНИ Δ-9 І Δ-12-АЦИЛ-ЛІПІДНИХ ДЕСАТУРАЗ ЦІАНОБАКТЕРІЙ

У даний час досить актуальним є збереження сільськогосподарських насаджень від температурних коливань, які викликають пошкодження мембран. Насамперед, зберегти продуктивність рослин дозволить збереження нормального функціонування рослинних мембран. Підвищуючи рівень ненасиченості жирних кислот (ЖК), можна збільшувати в'язкість мембран та знижувати температуру переходу із фази гелю в рідкокристалічну фазу. Ферменти, які сприяють утворенню подвійних звязків в насичених жирних кислотах, називають десатуразами. Десатурація ЖК в гліцероліпідах є однією з найважливіших реакцій, котра необхідна для підтримки фізичних властивостей мембранних ліпідів. [1].

У роботі ми застосовували гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. У даний час відомі гени чотирьох типів десатураз. Десатурація ЖК відбувається в строгій послідовності: перший подвійний зв'язок утворюється тільки в положенні Δ9, другий в положенні Δ12 тільки в моноєвих ЖК 16:1 або 18:1; подальша десатурація відбувається з використанням дієнових ЖК, передусім 18:2. Десатурази відрізняються різною субстратною специфічністю та різною субклітинною локалізацією [1]. В представленій роботі використовували гени *des*C (Δ9) *Synechoccus vulcanus* та *des*A (Δ12) *Synechocystis sp.* PCC 6803, злиті з репортерним геном *lic*BM3 термостабільної ліхінази *Clostridium thermocellum* під контролем конститутивного *35S* промотора ВМЦК [2, 3].

Однак слід відмітити, що загальні зміни жирнокислотного складу клітинних мембран є фактором, що може впливати на різні фізіологічні аспекти рослинної клітини. Такий вплив може мати як позитивний, так і негативний характер. Наприклад, рослини, більш стійкі до холодового стресу можуть бути більш чутливими до підвищенних температур. Тому при використанні генів десатураз для створення холодостійких сортів важливо перевіряти здатність трансгенних рослин зберігати життєздатність при підвищених температурах. Дослідження біохімії та молекулярної біології десатураз відкриває широкі перспективи в галузі біотехнології та сільського господарства, оскільки робить можливим генно-інженерне конструювання сортів та видів рослин, здатних переносити температурні обмеження тієї чи іншої кліматичної зони. Метою представленої роботи було дослідження фізіологічних властивостей рослин тютюну, які експресують гени десатураз ціанобактерій, в умовах гіпертермічного стресу.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*, сорт Wiskonsin), які експресують гени *des*C (Δ9) *Synechoccus vulcanus* та *des*A (Δ12) *Synechocystis sp.* PCC 6803, злиті з репортерним геном *lic*BM3 термостабільної ліхінази *Clostridium thermocellum* під контролем конститутивного *35S* промотора ВМЦК [2, 3]. Рослини вирощували на живильному середовищі MS протягом 3–4 тижнів. Контролем слугували нетрансформовані рослини тютюну та трансформанти, що несуть ген *gfp:licBM3*.

Рослини залишали на 36 годин в кліматичній камері WiseCube, при режимі: температура +42 °С, вологість 80 %, світловий день 16 год (7.00–23.00). Через 12 годин відбирали листкові експланти (приблизно 100 мг), обмивали в дезіонізованій воді, викладали в флакони по 20 мл та заповнювали дану місткість 20 мл дезіонізату. Потім інфільтрували 2 хв двічі з інтервалом 1 хв Закриті флакони виставляли на шейкер на 1,5–2 год. Після цього визначали кількість виходу електролітів, вимірюючи електропровідність за допомогою кондуктометра, після чого повертали розчин у флакон, виставляли на водяну баню при 100 °С на 30 хв. Після проварювань проб ви-

© КИРПА-НЕСМІЯН Т.М., ГЕРАСИМЕНКО І.М., САХНО Л.О., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА І.В., ШЕЛУДЬКО Ю.В.

мірювання електропровідності повторювали. Через 36 год виймали рослини з кліматичної камери та повторювали вимірювання виходу електролітів згідно протоколу, викладеного вище.

Визначення активності СОД проводили з використанням метода фотохімічного окислення нітроблакитного театразолія. Рослинний матеріал (100 мг) поміщали в пробірку Eppendorf (1,5 мл), розтирали з 1 мл 50 Мм Tris/HCl буфера та центрифугували при 13000 g (4 °C) протягом 15 хв. Надосадову рідину використовували для аналізу. Реакцію з нітроблакитним театразолієм проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалась із 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл буферу, 130 мкл 65 мМ метіоніну, 47 мкл 630 мкМ нітроблакитного тетразолію, 12,5 мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, іншу освітлювали протягом 5 хв в термостаті при 26 °C лампою білого кольору (люмінесцентна лампа T5/G5, модель ELI – 230 A – T5 – 8W). Вимірювали поглинання світла при 550 нм ракційною сумшшю, витриманою на світлі, проти поглинання світла пробою, витриманою в темряві, на фотометрі BioPhotometer (Ependorf) v.1.35. Нульова проба містила всі переліченні компоненти, за винятком рослинного екстракту, кількість буфера збільшилась в реакційній суміші до 550 мкл. Розрахунки проводили за формулою:

СОД (од./ мг СРБ) = log (OD550 ZERO/ OD550 EXP)/log(2) m,

де OD550 ZERO – оптична густина «порожнього» зразка, OD550 EXP – оптична густина експериментального зразка, m – масса СРБ в пробі (мг) [5].

Результати та обговорення

Електроліти забезпечують сталість осмотичного тиску рідин організму, ферментативні реакції дуже залежні від іонно-водного балансу (перехід АТФ в АДФ і навпаки, активація енолази, окиснювальне фосфорилування в мітохондріях, тощо). При пошкодженні мембран відбувається порушення електролітичного балансу за рахунок руйнування компартментів клітини. Порушення концентрації електролітів можуть призвести до безладної електричної активності та інгібіції ферментів. Дослідження рівня виходу електролітів, перевіряючи показники через 12 год та через 36 год, не показало суттєвої різниці між трансгенними та контрольними зразками (рис. 1).

Вивченню супероксиддисмутази (СОД) приділяється багато уваги, оскільки цьому ферменту відводиться важлива роль у захисті клітин і тканин від окисної деструкції. Активація СОД при несприятливих впливах оточуючого середовища є відповіддю на збільшення продукції радикалів супероксиду у цих умовах, що забезпечує захист клітин і тканин від окисних пошкоджень. Вимірювання активності СОД у даному дослідженні проводили через 12 год та через 36 год. Суттєвих відмінностей ми не помітили між контрольними

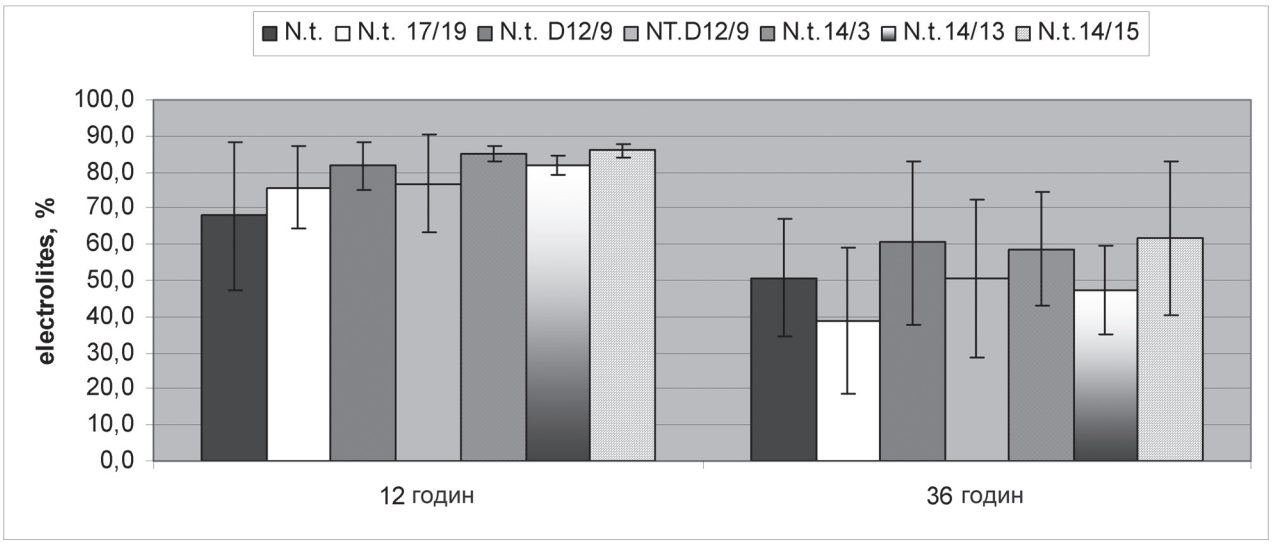

Рис. 1. Вихід електролітів в листках контрольних (*N. tabacum* дикого типу та трансгенної лінії, що несе ген gfp::lcBM3) та досліджуваних ліній (*N. tabacum*, що несе гени desC::lcBM3 (Δ9) та desA::lcBM3 (Δ12)) після 12 та 36 годин культивування при 42 °C

та дослідними рослинами як через 12 год, так і через 36 год.

Висновки

Таким чином, можна зробити висновок про те, що зміни жирнокислотного складу мембран рослин внаслідок експресії генів гетерологічних десатураз не впливають на їх характеристики при гіпертермічному стресі в досліджуваному діапазоні температур.

Робота виконувалась за підтримки гранта НАНУ УкрІНТЕІ № 0115*U004171*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – № 41 – С. 163–198.
2. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирузян 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. – С. 868–876.
3. 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. – С. 127–133.
4. Gerasymenko I.M., Sakhno L.O., Kyrpa T.M., Ostapchuk A.N., Khadjiev T.A., Goldenkova-Pavlova I.V., Sheludko Y.V. Characterization of Nicotiana tabacum plants expressing hybrid genes of cyanobacterial Δ9 or Δ12 acyl–lipid desaturases and thermostable lichenase // Russian J. Plant Physiol. – 2015. – N 62 (3). – C. 283–291.
5. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxiddismutase activity some large conseguences of minor changes in conditions // Anal. Biochem. – 1987. – 161, N 2. – P. 559–566.

KYRPA-NESMIYAN T.M. [1] GERASYMENKO I.M. [1], SAKHNO L.O. [1], GOLDENKOVA-PAVLOVA I.V. [2], SHELUDKO Y.V. [1]

[1] Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 148, e-mail: t-kirpa@ukr.net
[2] Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS,
Russia, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35

EFFECT OF HEAT STRESS ON PLANTS EXPRESSING GENES OF HYBRID CYANOBACTERIAL Δ-9- AND Δ-12-ACYL-LIPID DESATURASES

Aims. Glycerolipid fatty acids desaturation is one of the most important reactions in plant cell determining parameters of cell membrane. Introduction of heterologous desaturase genes is expected to improve plant cold resistance, but may affect their heat tolerance. We studied physiological characteristics of transgenic Nicotiana tabacum plants with modified fatty acid patterns expressing hybrid genes of desaturase desC (Δ9) *Synechoccus vulcanus* and desA (Δ12) Synechocystis sp. PCC 6803, fused with the reporter gene of thermostable lichenase licBM3 *Clostridium thermocellum*, controlled by the constitutive 35S promoter. ***Methods.*** We have determined electrolyte levels and superoxide dismutase activity of leaf explants at elevated temperatures (cultivation at 42^0C for 36 h). ***Results***. Analysis of these measurements showed no significant differences in control and experimental plants. ***Conclusions.*** Expression of cyanobacterial desaturase genes did not affect the heat tolerance of transgenic plants.

Keywords: acyl-lipid desaturase, cyanobacteria, desC (Δ9) *Synechoccus vulsanus*, desA (Δ12) *Synechocystis* sp., hyperthermal stress.