ВІСНИК
УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

УДК 581.1

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM*, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕНИ *DES*A АБО *DES*C В УМОВАХ СТРЕСІВ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

Т. М. КИРПА-НЕСМІЯН, М. В. КУЧУК, Ю. В. ШЕЛУДЬКО

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

Мета. *Модифікуючи рослинні організми методами генної інженерії для отримання сортів стійких до стресів знижених температур або заморозків необхідно перевіряти їх фізіологічні показники в умовах стресу підвищених температур.* ***Методи****. В даному дослідженні використовувались рослини Nicotiana tabacum, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій (desA або desC) в яких перевіряли рівень накопичення малонового диальдегіду та перевіряли експресію генів по репортерному білку термостабільної ліхенази після дії температурних стресів.* ***Результати.*** *Виявили зменшення рівня накопичення малонового диальдегіду у рослин, що експресують гени десатураз та підвищення активності експресії генів після холодового стресу та стресу високих температур.* ***Висновки****. Експресія генів десатураз ціанобактерій у рослин Nicotiana tabacum не підвищує їх чутливість до стресу високих температур.*

Ключові слова: *ацил-ліпідні десатурази, малоновий диальдегід, термостабільна ліхеназа.*

Велика частина рослин на нашій планеті потерпає від різноманітних абіотичних стресів, що несприятливо впливають на врожайність сільськогосподарських культур. Вивчення пошкоджень, що виникають внаслідок температурного впливу є актуальною темою для досліджень. Насамперед, стійкість рослин до температурних стресів залежить від властивостей мембран. Знижуючи температуру переходу із фази гелю (яка є твердою фазою) в рідкокристалічну фазу можна знизити чутливість рослин до низьких температур. Це забезпечується завдяки зсуву спектру жирних кислот (ЖК) з насичених в ненасисичені. Десатурази є ферментами, які сприяють утворенню подвійних зв'язків у відповідних положеннях ЖК та тим самим перетворюють насичені жирні кислоти в ненасичені [2]. В 1973 році вперше була запропонована теорія про те, що вирішальна роль в холодостійкості рослин залежить від фазових переходів їх мембран за умов впливу навколишнього середовища.

Десатурація потребує наявності молекулярного кисню та проходить в аеробних умовах. Десатурази були знайдені практично у всіх організмах, за винятком деяких бактерій, наприклад *Escherichia coli*. Вважається, що активні десатурази зв'язують два атоми трьохвалентного заліза та формують активний комплекс з атомом кисню: Fe-O-Fe. Цей комплекс розриває неактивовані –C-H- зв'язки та тим самим сприяє утворенню подвійних зв'язків –C = C- в ланцюгах ЖК [5].

У рослинному організмі функціонує два типи десатураз: ацил-ліпідні (використовують в якості субстрату ЖК, що знаходяться у складі ліпідів) та ацил-АПБ (використовують в якості субстрату ЖК асоційовані з переносним білком). Десатурази ціанобактерій відносяться до ацил-ліпідних десатураз [6]. На даний час клоновано гени чотирьох типів цих десатураз $\Delta 6$ $\Delta 9$ $\Delta 12$ та $\omega 3$. Десатурація проходить в строгій послідовності: спочатку утворюються подвійні звязки в положенні $\Delta 9$, потім $\Delta 12$, а вже за ними в $\Delta 6$ та $\omega 3$.

Однак, втручаючись в жирнокислотний склад мембран можна досягти як позитивного ефекту (стійкість рослин до низьких температур) так і негативного ефекту (підвищена чутливість до високих температур).

© Т. М. КИРПА-НЕСМІЯН, М. В. КУЧУК, Ю. В. ШЕЛУДЬКО, 2016

Тому потрібно досліджувати рослини, що експресують додаткові гени десатураз під впливом як низьких так і високих температур.

Шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було отримано рослини *Nicotiana tabacum*, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз desC (Δ9) ціанобактерії *Synechoccus vulganus* або desA (Δ12) ціанобактерії *Synechocystis sp.* PCC 6803, злиті з репортерним геном термостабільної ліхенази Clostridium thermocellum licBM3 під контролем конститутивного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК). Дані гени характеризуються різною субстратною специфічністю та локалізацією дії (хлоропласти — *des*C та цитоплазма — *des*A). Результати генетичного аналізу показали, що в клітинах рослин є декілька типів Δ9-ацил-ліпідних десатураз і утворення олеїнової кислоти відбувається лише в стромі хлоропластів. Для того, щоб забезпечити пластидну локалізацію Δ9 десатурази -5'-кінцева область гену *des*C:*lic*BM3 була злита в одній рамці зчитування з послідовністю, що кодує транзитний пептид малої субодиниці RTP *Arabidopsis thaliana*. Як контроль використовувся тютюн дикого типу та тютюн, що експресує ген *gfp:lic*BM3 [3]. Було виявлено за допомогою методу газової хроматографії та масспектрометрії збільшення частки лінолевої та ліноленової кислот в трансгених рослин, що несуть гени *des*A та *des*C відповідно. Відомо, що під впливом стресових температур підвищується утворення активних форм кисню, які здатні викликати незворотні пошкодження мембран та органел клітин. Утворення вільних радикалів є постійним процесом в рослинному організмі, але під впливом несприятливих умов їх велика кількість може окислювати компартменти клітини. Одним із згубних наслідків цього процесу є утворення малонового диальдегіду (МДА) [7], що є результатом розриву вільними радикалами ненасичених жирних кислот. Цей біфункціональний альдегід утворює шифонові основи з аміногрупами білку та виступає в ролі зшиваючого агенту. В результаті такого зшивання утворюються нерозчинні ліпід-білкові комплекси, які негативно впливають на клітину. В даній роботі представлені результати досліджень накопичення малонового альдегіду як маркеру окисної деструкції в рослин, що експресують гени гетерологічних десатураз з різною локалізацією субстрату. Також перевіряли експресію генів десатураз по репортерному білку термостабільної ліхенази.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували рослини віком 4–5 тижнів, які були вирощені *in vitro,* за умов: температура +25 °С, вологість 40–50 %, фотоперіод 10–18 (6 год), середовище Муросіге-Скуге (Рис. 1).

Рисунок 1. Рослини, що використовувались для досліджень. a — контрольна рослина *Nicotiana tabacum;* b — контрольна трансгенна рослина, що несе у собі гібридний ген *gfp:lic*BM3; c, d — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген *des*A:*lic*BM3; e, f, g — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген RTP:*des*C:*lic*BM3.

Холодовий стрес. Листкові експланти (приблизно по 100 мг) вирізали із повністю сформованих верхніх листків рослин. Експланти промивали дистильованою водою, переміщували в скляні флакони та інкубували за умов холодового стресу 0 °С 20 хв, –5 °С.

Умови гіпертермічного стресу. Дослідні рослини інкубували при 42 °С, вологість 80 %, фотоперіод 16 год. (7–23 год.), 36 год., відбирали експланти (приблизно по 100 мг) вирізали із повністю сформованих верхніх листків рослин, промивали дистильованою водою, та використовували для визначення активності ліхенази і рівня накопичення малонового діальдегіду.

Визначення концентрації малонового діальдегіду. Малоновий діальдегід визначали за

допомогою його здатності зв'язуватись з тіобарбітуратовою кислотою утворюючи червоний флуоресцентний склад, що дозволяє проводити приблизний спектрофометричний аналіз вмісту МДА за методикою [4]: 100 мг рослинного зразку відбирали та розтирали в 1,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти, відцентрифуговували при +4 °С 10000 15 хв, після чого відбирали 300 мкл супернатанту та переносили в пробірки ємністю 1,5 мл із 1,2 мл 5 % тіобарбітуратової кислоти в 20 % трихлороцтовій кислоті. Інкубували 30 хв при 95 °С. Відцентрифуговували 15 хв при 10000 та вимірювали ОД при 532 нм, потім ОД при 600 нм.

Визначення активності ферменту ліхенази. Активність ліхенази вимірювали використовуючи ліхенан («Sigma», USA) в якості субстрата. Концентрацію відновлених цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованому по глюкозі. За одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлених цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 хв (в перерахунку на 1 мг білку). Питому активність розраховували на кількість білку. Для приготування екстрактів сумарного розчинного білку листкові експланти гомогенізували в подвійному об'ємі буферу, що містив 0,1 М Tris – HCl (pH 8.0), 0,005 М Na2EDTA, 0,1 М NaCl та 0,01 М ß-меркаптоетанол. Концентрацію білку визначали за методом Bradford, використовуючи калібрувальну криву побудовану для стандартних розчинів БСА («Fermentas»). Використовували 500 мкл суміші (10 мкл білкового екстракту + 100 мкл ліхенану 0,5 % у воді, 390 мкл води) інкубували при 65–70 °С 1 год, потім додавали 500 мкл 1 % розчину ДНС та 165 мкл К-Na-тартрату 40 %, кип'ятили на водяній бані 10 хв при 95–100 °С. Залишали охолоджуватись на льоді (при +4 °С), потім 15–20 хв за кімнатної температури. Вимірювали ОД при 510 нм.

Статистичний аналіз. У всіх експериментах використовували 12 біологічних повторностей, аналітичних 1.

Середнє значення, стандартні відхилення та довірчий інтервал розраховували за допомогою програми Exel. Достовірність різниці між вибірковими середніми оцінювали за допомогою парного t-теста Стьюдента. Значення *p* розраховували за допомогою програми Exel.

Результати та обговорення

Вимірювали рівень накопичення малонового диальдегіду та рівень експресії генів після дії низьких температур. Малоновий диальдегід виступає як маркер окисної деструкції ненасичених ЖК. Хоча, дослідження показали, що частка ненасичених ЖК у рослин, що несуть гени ацил-ліпідних десатураз зросла, проте, рівень накопичення малонового діальдегіду набагато вищий у контрольних рослин, що вказує на процеси окисної деструкції. Найвищий рівень накопичення МДА спостерігався у контрольних трансгенних рослин, що експресують ген *gfp:lic*BM3 (Рис. 2).

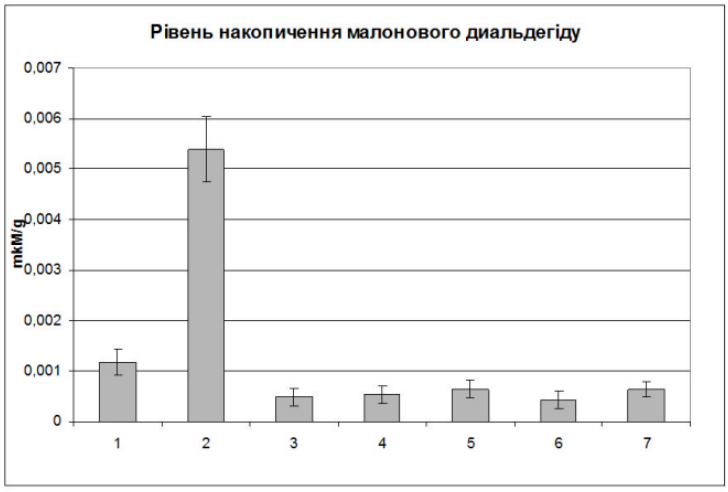

Рисунок 2. Рівень накопичення малонового диальдегіду після дії холодового стресу. 1 — контрольна рослина *Nicotiana tabacum;* 2 — контрольна трансгенна рослина, що несе у собі гібридний ген *gfp:lic*BM3; 3, 4 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген *des*A:*lic*BM3; 5, 6, 7 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген RTP:*des*C:*lic*BM3.

Дані результати лише підтверджують попередні дослідження з рослинами, що експресують гени десатураз ціанобактерій [3].

Перевіряли експресію генів десатураз по репортерному білку термостабільної ліхенази. Рівень активності ферменту ліхенази вказує на рівень експресії генів десатураз, оскільки ген термостабільної ліхенази *lic*BM3 знаходиться в одній рамці зчитування з геном ацил-ліпідної десатурази *des*A або *des*C. Даний репортерний білок зручний тим, що його активність можна прорахувати на кількість розчинного білку [8]. Дослідження експресії гену показало підвищення порівняно з трансгеним контролем. Тютюн дикого типу не досліджували, оскільки отримані значення в даній реакції близькі нулю. Дослідження активності ліхенази після дії холодового стресу показало підвищення активності данного ферменту у рослин, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій (Рис. 3).

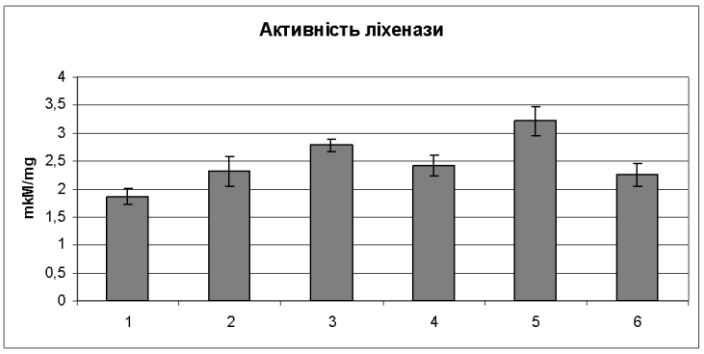

Рисунок 3. Дослідження експресії генів по репортерному білку. 1 — контрольна трансгенна рослина, що несе у собі гібридний ген *gfp:lic*BM3; 2, 3 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген *des*A:*lic*BM3; 4, 5, 6 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген RTP:*des*C:*lic*BM3.

Після дії гіпертермічного стресу також перевіряли рівень накопичення малонового диальдегіду та рівень експресії перенесених генів термостабільної ліхенази по репортерному білку (Рис. 4).

Рисунок 4. Рівень накопичення малонового диальдегіду після дії гіпертермічного стресу. 1 — контрольна рослина *Nicotiana tabacum;* 2 — контрольна трансгенна рослина, що несе у собі гібридний ген *gfp:lic*BM3; 3, 4 — трансгенні лінії рослин, що несуть в собі ген *des*A:*lic*BM3; 5, 6, 7 — трансгенні лінії рослин, що несуть в собі ген RTP:*des*C:*lic*BM3.

Аналізували показники через 12 год через 36 год культивування рослин в умовах стресу. Взагалі, рослини відчувають стрес уже при підвищенні температури до 35–40 °С. Перша відповідать рослинного організму на стрес визначає як в подальшому буде проходити адаптація або у випадку дії сильного стресу загибель організму, оскільки накопичення продуктів окиснення ліпідів та згубна дія оксидних радикалів негативно впливає на гомеостаз організму. Виявили, що рівень накопичення малонового діальдегіду менший у трансгеного тютюну, що експресує додаткові гени десатураз.

Рівень експресії генів десатураз по аналізу активності репортерного білку термостабільної ліхенази після дії гіпертермічного стресу проводили через 12 год та через 36 год (Рис. 5).

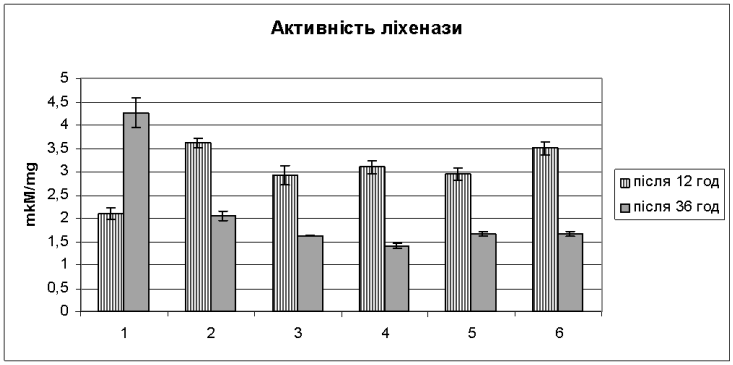

Рисунок 5. Дослідження експресії генів по репортерному білку. 1 — контрольна трансгенна рослина, що несе у собі гібридний ген *gfp:lic*BM3; 2, 3 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген *des*A*:lic*BM3; 4, 5, 6 — трансгенні лінії рослин, що несуть собі ген *des*C*:lic*BM3.

Виявили, що через 12 год дії підвищеної температури (+42 °С), як стресового фактора рівень експресії генів десатураз зріс. Однак, після 36 год дії гіпертермічного стресу спостерігалось зменшення експресії даних генів, що вказує на адаптативну реакцію рослин.

Ген *des*C *(Δ9)*, використовує в якості субстрату стеаринову кислоту та перетворює її в олеїнову кислоту; ген *des*A *(Δ12)* використовує в якості субстрату олеїнову кислоту та перетворює її в лінолеву кислоту. Зміни, що проходять для адаптації жирнокислотного складу мембранних ліпідів ціанобактерій під дією низьких температур уже давно відомі. Вважається, що низькі температури можуть викликати підвищення активності пресинтезованих десатураз, тобто, при зниженні температури сповільнюється синтез насичених ЖК *de novo*, в той час як активність десатураз не змінюється, внаслідок чого співвідношення насичених і ненасичених змінюється в сторону збільшення ненасичених.

Малоновий диальдегід здатний пошкоджувати мембрани, ДНК. Виявлено, що ця речовина здатна реагувати з ДНК утворюючи при цьому ДНК-адукти, в першу чергу мутагенний M_1G [7]. Підвищення рівня накопичення МДА служить маркером окисної деструкції ненасичених ЖК та вказує на згубну дію стресора.

Рівень накопичення малонового диальдегіду був нижчим ніж у котрольних рослин як за дії високих так і при дії низьких температур. В рослин, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз загалом більший вміст ненасичених ЖК порівняно з контрольними трансгенними та не трансгенними рослинами, але рівень накопичення малонового диальдегіду більший у нетрансгенних рослин. Оскільки МДА є показником окисної деструкції клітин, органел, компартментів, ДНК, ненасичених ЖК можна зробити висновок про кращу адаптацію рослин, що несуть в собі гени десатураз як до дії низьких температур так і до дії високих температур в досліджуваному діапазоні.

Порівнюючи результати досліджень впливу двох протилежних температурних стресів, виявили деякі спільні риси за фізіолого-біохімічними характеристиками рослин, що несуть гени десатураз ціанобактерій з різною субстратною специфічністю.

В даному дослідженні як біфункціональний репортер використовувався ген термостабільної ліхенази анаеробної бактерії *Clostridium thermocellum.* Дана ціанобактерія використовується у виробництві, завдяки своїй здатності розчиняти целюлозу з утворенням етилового спирту (C_2H_5OH). Проведені дослідження з *Clostridium thermocellum* показали, що один з її білків здатний розщеплювати полісахариди, в яких молекули глюкози звязані β-1,3 та β-1,4 звязками, які чергуються. Такі полісахариди дуже рідко зустрічаються у рослинах та більшості інших організмів. Але вони були виділені з лишайників (ліхенани), тому фермент отримав назву «ліхеназа». Подальший аналіз показав, що даний білок є досить невеликим — приблизно 35 кДа або 334 амінокислотних залишків, найкраще працює за умов 70–80 °С. Продукт даної реакції є глюкоза, її кількість можна визначити простими біохімічними методами.

Внаслідок видалення областей, які не впливають на ферментативну активність і стабільність, можна додатково зменшити розміри молекул до 26 кДа. Ефективна експресія в клітинах рослин, грибів та бактерій показала, що модифікований фермент *Clostridium thermocellum* може використовуватись як репортер, який є досить стабільний, специфічний чутливий та зручний для злиття з іншими білками [1].

Дослідження рівня експресії генів десатураз показало підвищення за дії низьких температур та зниження за дії високих температур. Це свідчить, що вставка в геном досліджуваних генів не вплинула на роботу сигнальних білків та адаптацію рослин. Порівнюючи результати досліджень впливу двох протилежних температурних стресів, виявили деякі спільні риси за фізіолого-біохімічними характеристиками рослин, що несуть гени десатураз ціанобактерій з різною субстратною специфічністю.

Висновок

Експресія генів ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій у рослин *Nicotiana tabacum* не підвищує їх чутливості до дії стресових високих температур. Навпаки, спостерігається зниження рівня накопичення МДА, що вказує на менший ступінь окисної деструкції порівняно з контрольними рослинами тютюну.

Перелік літератури

1. *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. — Т. 36. — № 4. — С. 868–876.
2. *Amiri R. M, Yur'eva N. O., Shimshilashvili K. R., et. al.* (2010) Expression of acyl-lipid Delta12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. J Integr Plant Biol 52:289-297. doi:JIPB890.
3. *Gerasymenko I. M., Sakhno L. O., Kyrpa T. M., et. al.* (2015) Characterization of Nicotiana tabacum plants expressing hybrid genes of cyanobacterial Δ9 or Δ12 acyl–lipid desaturases and thermostable lichenase. Russian J. Plant Physiol. 62(3), 283–29.
4. *Janero D. R.* Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnosticindices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, Free Rad. Biol. Med.9:515-540; 1990.
5. *Los D. A., Murata N.* (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Bi°Chim Biophys Acta 1666:142-157. doi:S0005-2736(04)00203-2.
6. *Maali R. A., Goldenkova-Pavlova I. V., Pchelkin V. P., et al.* (2007) Acyl-lipid Δ12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (Solanum tuberosum L.). Biologija 53:4–7 a.
7. *Marnett L. J.* Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde (1999) Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 424 (1–2), pp. 83–95.
8. *Piruzian E., Goldenkova I., Musiychuk K., et.al.* A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from Clostridium thermocellum // Mol. Genet. Genom. 2002. V. 266. P. 778−786.

Представлена Дубровною О. В.
Надійшла 19.10.2016

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ *DES*A ИЛИ *DES*C В УСЛОВИЯХ СТРЕССОВ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУР

Т. Н. Кирпа-Несмиян, Ю. В Шелудько, Н. В. Кучук

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины
Украина,03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
e-mail: t-kirpa@ukr.net

Цель. Модифицируя растительные организмы методами генной инженерии для получения сортов устойчивых к стрессам пониженных температур или заморозков необходимо проверять их физиологические показатели в условиях стресса повышенных температур. **Методы.** В данном исследовании использовались растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий (*des*A или *des*C) в которых проверяли уровень накопления малонового диальдегида а также экспрессию генов по репортерному белку термостабильной лихеназы после воздействия температурных стрессов. **Результаты.** Обнаружили снижение уровня накопления малонового диальдегида у растений, экспрессирующих гены десатураз и повышение активности экспрессии генов после холодового стресса и стресса высоких температур. **Вывод.** Экспрессия генов десатураз цианобактерий у растений *Nicotiana tabacum* не повышает их чувствительность к стрессу высоких температур.

Ключевые слова: ацил-липидные десатуразы, малоновый диальдегид, термостабильная лихеназа.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESEARCH CHARACTERISTICS OF PLANT NICOTIANA TABACUM, EXPRESSING GENES *DES*A OR *DES*C UNDER DIFFERENT TEMPERATURES STRESS

T. M. Kyrpa-Nesmiian, Y. B. Sheludko, M. V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU
148, Academika Zabolotnoho St., 03143, Kyiv.
e-mail: t-kirpa@ukr.net

Aim. For modifying of the plant organisms with genetic engineering techniques to produce genus stress resistant low temperatures or frosts it is necessary to check their physiological characteristics at high temperatures stress. **Methods**. In this study we used *Nicotiana tabacum* plants, expressing of cyanobacterial acyl-lipid desaturases genes (*des*A or *des*C), plants were tested for the level of malondialdehyde accumulation and gene expression by the reporter protein thermostable lichenase after exposure to thermal stress. **Results.** We discovered the reduced malondialdehyde accumulation in plants and increased expression desaturases genes after cold stress and high temperature stress. **Conclusions**. Cyanobacterial desaturases gene expression in *Nicotiana tabacum* plants did not increase their sensitivity to the high temperatures stress**.**

Keywords: acyl-lipid desaturases, malondialdehyde, thermostable lichenase.