

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM*, ЩО НЕСУТЬ ГЕНИ $\Delta 9$ - ТА $\Delta 12$ -АЦИЛ-ЛІПІДНИХ ДЕСАТУРАЗ ЦІАНОБАКТЕРІЙ, ВИРОЩЕНИХ *IN VIVO* В УМОВАХ ЗАМОРОЗКІВ

Збереження рослин від пошкоджень, що виникають внаслідок температурних коливань є досить актуальним у наш час. Насамперед адаптаційні можливості рослинних мембран залежать від складу мембранних ліпідів, оскільки зі збільшенням в'язкості та плинності мембранних ліпідів знижується температура переходу із фази гелю (яка є твердою фазою) у рідкокристалічну фазу [1]. Це забезпечується завдяки зсуву спектра жирних кислот (ЖК) з насичених у ненасичені. Утворення подвійних зв'язків ЖК відбувається завдяки ферментам десатуразам. Загалом ці ферменти поділяються на три групи залежно від переносника субстрату: ацил-ліпідні десатурази використовують у якості субстрата ЖК; ацил-АПБ використовують ЖК і зв'язані з ацил-переносним білком, ацил-КоА використовують ЖК і приєднані до коферменту. У рослин функціонують два види десатураз – ацил-АПБ та ацил-ліпідні десатурази [2]. У роботі ми використовували гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. Вони утворюють подвійні зв'язки у строгой послідовності: спочатку утворюються подвійні зв'язки в положеннях $\Delta 9$ та $\Delta 12$, а вже потім – у положеннях $\Delta 6$ та $\omega 3(\Delta 15)$ [3].

У дослідженні використовували гени ціанобактерій *Synechococcus vulgaris* та *Synechocystis sp.* PCC 6803, оскільки вони є давніми організмами та мають високу адаптацію до абіотичних стресів. Було клоновано генетичні вектори, які несуть гени ацил-ліпідних десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulgaris* та *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis sp.* PCC 6803, злиті з репортерним геном термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum licBM3*, під контролем конститутивного *35S* промотора. Оскільки субстратом гена $\Delta 9$ ацил-ліпідної десатурази є стеаринова кислота, яка локалізується у хлоропластах, для того, щоб забезпечити пластидну локалізацію продукту до гібридного гена *desC::licBM3*, було приєднано послідовність транзитного пептиду малої субодиниці РУБІСКО *Arabidopsis thaliana*

(ген *ats 1A*). Внаслідок *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації було отримано три лінії, які експресують ген *desC*, та дві лінії рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують ген *desA* [4]. Як контроль використовували рослини дикого виду та трансформанти, що несуть ген *gfp:licBM3* того ж виду.

Ці рослини вирощувалися *in vitro* та були протестовані на стійкість до впливу низьких температур. Також було досліджено склад ЖК за допомогою методу газової хроматографії та мас-спектрометрії. Виявили збільшення частки ліноленової кислоти у рослин, що експресують ген $\Delta 9$ десатурази, та лінолевої у рослин, що експресують ген $\Delta 12$ десатурази [5]. Проте рослини, які культивуються в умовах *in vitro*, можуть відрізнятися своїми фізіолого-біохімічними показниками та адаптивними реакціями від рослин, вирощених *in vivo*. У роботі представлені результати досліджень рослин *Nicotiana tabacum*, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій та були вирощені в умовах ґрунту.

Матеріали і методи

Вирощування рослин *in vivo*. Відбирали рослини віком 2–3 тижні, що вкорінилися на середовищі Мурасіге-Скуга в умовах *in vitro*. Переводили в ґрунт шляхом висаджування в пластикові стакани ємністю 500 мл. У роботі використовувалися рослини *Nicotiana tabacum*, вирощені *in vivo* за температурного режиму +10 – +25°C, освітлення 7 год (11–18), вологість 30–40 %. Досліджували рослини віком 4–5 тижнів. Використовувалися верхні розкриті листки.

У всіх експериментах кількість біологічних повторностей 12, аналітичних – 1.

Визначення активності супероксиддисмутази. Листкові експланти (приблизно по 100 мг) вирізували із повністю сформованих верхніх листків рослин. Експланти промивали дистильованою водою, переміщували в скляні флакони та

інкубували за умов холодового стресу: 0°C 20 хв, -5°C 80 хв.

Аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутази за методикою з використанням методу фотохімічного окислення нітроголубого театразолію [6]. Рослинний матеріал (100 мг) поміщали в пробірку Eppendorf (1,5), розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера та центрифугували при 13000 g (4C) протягом 15 хв. Супернатант використовували для аналізу. Реакцію з нітроголубим театразолієм проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалась із 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл буфера, 130 мкл 65 Мм метіоніну, 47 мкл 630 мкМ нітроголубого театразолію, 12,5 мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, іншу освітлювали протягом 5 хв у термостаті при 26°C лампою білого кольору (люмінесцентна лампа T5/G5, модель ELI – 230 А – T5 – 8W). Вимірювали адсорбцію при 550 нм. Реакційна суміш, яка була витримана в темряві, випростовувалася як фон для вимірювань зразків, що були витримані на світлі. Вимірювання проводилися на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Нульова проба містила всі перелічені компоненти, за винятком рослинного екстракту, кількість буфера в реакційній суміші збільшували до 550 мкл. Розрахунки проводили за формулою:

$$\text{СОД (од./мл сум)} = (\text{ОД 1} / \text{ОД 2} - 1) (\text{ФР}),$$

Де ОД 1 – оптична щільність нульової проби;
ОД 2 – оптична щільність експериментальної проби;
ФР – фактори розведення = об'єм реакційної суміші, мл/об'єм використаного рослинного екстракту, мл. Активність СОД виражали в од. акт./мг білку [7].

Визначення рівня виходу електролітів. Із рослин відбирали листові експланти приблизно 100 мг, обмивали в дезіонізації, викладали у флакони по 20 мл та заповнювали їх 20 мл дезіонізатору. Потім інфільтрували 2 хв двічі з інтервалом 1 хв. Закриті флакони витримували на шейкері протягом 1,5–2 год. Після цього вимірювали кількість виходу електролітів, потім повертали вміст назад до флакона, виставляли на водяну баню при 100°C на 30 хв. Після проварювань проб вимірювання повторювали.

Визначення рівня накопичення малонового діальдегіду. Малоновий діальдегід визначали за допомогою його здатності вступати в реакцію з тіобарбітуратом кислотою, утворюючи червону флуоресцентну сполуку, що дозволяє проводи-

ти приблизний спектрофотометричний аналіз вмісту МДА. 100 мг рослинного зразка відбирали та розтирали в 1,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти, відцентрифугували при +4°C 10000 15 хв, після чого відбирали 300 мкл супернатанту та переносили в епіндорф із 1,2 мл 5 % тіобарбітуратом кислоти в 20 % трихлороцтової кислоті. Інкубували 30 хв при 95°C. Відцентрифугували 15 хв при 10000 та вимірювали ОД при 532 нм та 600 нм [8]. Розрахунки проводили за формулою:

$$C_x = (E_{532} - E_{600}) * V_e * 2 / k * m_s * V_a,$$

де C_x – вміст малонового діальдегіду, мкмоль/г сирової ваги; E – оптична густина розчину; V_e – об'єм екстракту; V_a – об'єм екстракту взятий для аналізу, мл; k – коефіцієнт молярної екстинції МДА ($156 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); m_s – маса зразку взята для екстракції, г.

Кількісна ліхеназна реакція. Для приготування екстрактів сумарного розчинного білка листові експланти гомогенізували в подвійному об'ємі буфера, що містив 0,1 М Tris – HCl (рН 8,0), 0,005 М Na_2EDTA , 0,1 М NaCl та 0,01 М β -меркаптоетанол. Концентрацію білка визначали за методом Bradford, використовуючи калібрувальну криву, побудовану для стандартних розчинів БСА ("Fermentas"). Активність ліхенази вимірювали, використовуючи ліхенан ("Sigma", USA) у якості субстрата. Визначення відновлюючих цукрів проводили за методом [9]. Концентрацію відновлених цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованим 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 білка). Питому активність розраховували на кількість білка. Методика визначення: 500 мкл зразка, що містить 10 мкл білкового екстракту, + 100 мкл ліхенану (0,5 % у воді), + 390 мкл H_2O та інкубувати при 65–70°C 1 год, потім додати 500 мкл динітросаліцилової кислоти та 165 мкл K-Na-таратрат 40 %, кип'ятити на водяній бані 10 хв при 95–100°C. Залишили охолоджуватися на льоду (при +4° C), потім витримати 15–20 хв за кімнатної температури. Вимірювали ОД при 510 нм та 600 нм.

Статистичний аналіз. Середні значення, стандартні відхилення та довірчий інтервал розраховували за допомогою програми Excel. Достовірність різниці між вибірковими середніми оцінювали за допомогою парного t-тесту Стьюдента. Значення «р» розраховували за допомогою програми Excel.

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 фосфорилювання в мітохондріях). Рівень виходу електролітів вказує на рівень пошкодження мембран. Аналізуючи рівень виходу електролітів внаслідок пошкоджень мембран, дослідили, що за цим показником виявлено більше пошкоджень у контрольних рослинах. Рослини, що експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, показали нижчий рівень виходу електролітів (рис. 1).

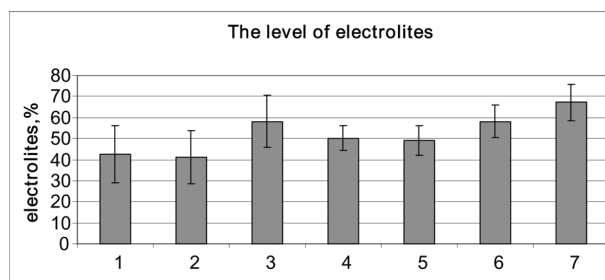


Рис. 1. Рівень виходу електролітів досліджуваних рослин: 1 – *Nicotiana tabacum*, 2 – рослина з геном *GFP::licBM3*; 3, 4 – рослини з генами *desA::licBM3*; 5, 6, 7 – рослини з генами *RTP::desC::licBM3*

Вивченню супероксиддисмутази (СОД) приділяється багато уваги, оскільки цьому ферменту відводиться важлива роль у захисті клітин і тканин від окисної деструкції [10]. Активація СОД за несприятливих умов навколишнього середовища є відповіддю на збільшення продукції радикалів супероксиду в цих умовах, що забезпечує захист клітин і тканин від окисних пошкоджень. У процесі досліджень було виявлено підвищення активності цього ферменту у рослин, які несуть гени десатураз (рис. 2), що свід-

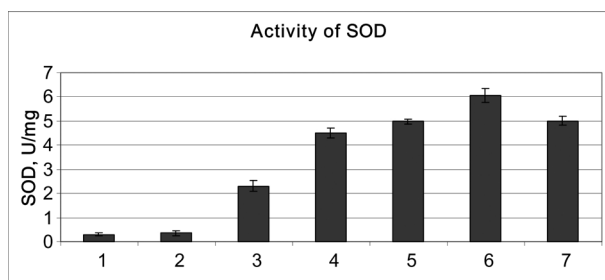


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази досліджуваних рослин: 1 – *Nicotiana tabacum*, 2 – рослина з геном *GFP::licBM3*; 3, 4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5, 6, 7 – рослини з геном *RTP::desC::licBM3*

чить про кращий захист клітин та їх компартментів від окисної деструкції [11].

Малоновий диальдегід або малондиальдегід (МДА) – альдегід із формулою $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ – утворюється в клітинах при деградації ненасичених жирних кислот, служить тестом перекисидування ЖК [12]. 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 . Підвищення рівня накопичення малонового диальдегіду служить маркером окисної деструкції та вказує на згубну дію стресора [13].

Щодо рівня накопичення МДА – спостерігали зниження даного показника у трансгенних рослин, що експресують гени десатураз. У тютюну дикого типу виявили найвищий рівень пошкоджень (рис. 3).

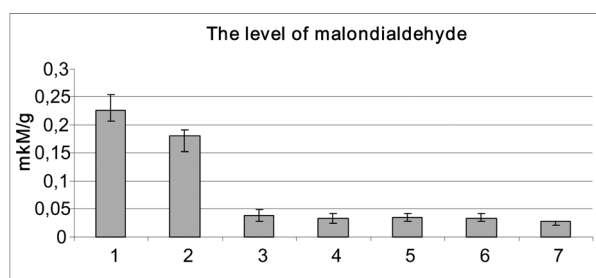


Рис. 3. Рівень малонового диальдегіду досліджуваних рослин: 1 – *Nicotiana tabacum*, 2. – рослина з геном *GFP::licBM3*; 3, 4 – рослини з геном *desA::licBM3*; 5, 6, 7 – рослини з геном *RTP::desC::licBM3*

Кількісна ліхеназна реакція в цього випадку використовувалася як маркер експресії генів десатураз ціанобактерій [14], оскільки ген цього ферменту знаходиться в одній рамці зчитування з генами ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій. Вимірювали показники після дії заморозків та виявили збільшення активності цього ферменту у трансгенних рослин, що експресують ген *desA* і *desC* (рис. 4).

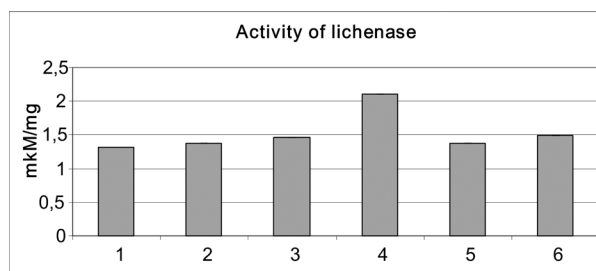


Рис. 4. Активність ліхенази досліджуваних рослин: 1 – рослина з геном *GFP::licBM3*; 2, 3 – рослини з геном *desA::licBM3*; 4, 5, 6 – рослини з геном *RTP::desC::licBM3*

Висновки

Підсумовуючи отримані результати стосовно рівня виходу електролітів, активності ферменту супероксиддисмутази, рівня накопичення малонного діальдегіду та експресію гена по репортерному білку термостабільної ліхенази, можна зробити висновок, що рослини *Nicotiana tabacum*, трансформовані генами ацил-ліпідних десатураз, мають сильнішу дію адаптації до умов заморозків порівняно з контролем. Рівень пошкоджень у рослин, що експресують додаткові гени

десатураз, набагато нижчий, ніж у контрольних рослин. Це забезпечується завдяки активності ферменту СОД, який зв'язує вільні кисневі радикали, про що свідчить рівень накопичення малонного діальдегіду. Вирощування рослин тютюну в умовах *in vivo* не має суттєвого впливу на експресію генів десатураз та характер пошкоджень внаслідок дії низьких температур у досліджуваному діапазоні.

Робота виконувалася за підтримки гранту НАНУ УкрІНТЕІ № 0115U004171.

ЛІТЕРАТУРА

1. Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – 1666. – P. 142–157.
2. Maali R.A., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. Acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Biologija.* – 2007. – 53. – P. 4–7.
3. Los D.A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – 1394. – P. 3–15.
4. Berdichevets I.N., Shimshilashvili H.R., Gerasymenko I.M., Sindarovska Y.R., Sheludko Y.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – 397. – P. 2289–2293.
5. Gerasymenko I.M., Sakhno L.O., Кирпа Т.М., Ostapchuk A.N., Khadjiev T.A., Goldenkova-Pavlova I.V., Sheludko Y.V. Characterization of *Nicotiana tabacum* plants expressing hybrid genes of cyanobacterial $\Delta 9$ or $\Delta 12$ acyl-lipid desaturases and thermostable lichenase // *Russian J. Plant Physiol.* – 2015. – 62, № 3. – P. 283–291.
6. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions // *Anal. Biochem.* – 1987. – 161. – P. 559–566.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle to protein dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72. – P. 248–254.
8. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury // *Free Rad. Biol. Med.* – 1990. – 9. – P. 515–540.
9. Wood T.M., Bhat K.M. Methods for measuring cellulase activities // *Methods Enzymol.* – 1988. – 160. – P. 87–112.
10. Mann T., Keilin D. Hemocuprein and hepatocuprein copperprotein compounds of blood and liver in mammals // *Proc.R. Soc. Lond. B.* – 1938. – 126. – P. 303–315.
11. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // *Цитология.* – 2006. – 48, № 6. – P. 465–474.
12. Marnett L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 1999. – 424, № 1–2. – P. 83–95.
13. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty peroxidation // *Archives of Biochem. and Biophys.* – 1986. – 125. – P. 185–198.
14. Komakhin R.A., Abdeeva I.A., Salekhi Dzhuzani G.R., Goldenkova I.V., Zhuchenko A.A. Thermostable lichenase as a translational reporter // *Genetika.* – 2005. – 41. – P. 30–39.

KYRPA-NESMIAN T.M.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: t-kirpa@ukr.net

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *NICOTIANA TABACUM* PLANTS, CARRYING CYANOBACTERIUM $\Delta 9$ - AND $\Delta 12$ -ACYL-LIPID DESATURASES GENES, GROWN *IN VIVO* AT FROST CONDITIONS

Aim. Plant resistance to cold depends on the composition of membrane lipids. Desaturases are enzymes that form double bonds in fatty acids and convert saturated fatty acids into unsaturated. **Methods.** The paper used the plant *Nicotiana tabacum*, which carry genes $\Delta 9$ - and $\Delta 12$ -acyl of lipid desaturases from cyanobacteria, which were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. These plants are transferred to soil and exposed to low temperatures. After this, activity of superoxide dismutase, levels of malondialdehyde and electrolytes and performance of reporter gene expression by protein were measured. The control wild-type *Nicotiana tabacum* plant and *Nicotiana tabacum* expressed to *gfp: licBM3* were used in the experiment. **Results.** It was found that tobacco plants had been less damaged compared to the control ones. **Conclusions.** Growing plants *Nicotiana tabacum*, in soil affects neither desaturases gene expression nor their resistance to cold stress.

Keywords: acyl-lipid desaturases, superoxide dismutase, malondialdehyde, electrolytes, lichenase.