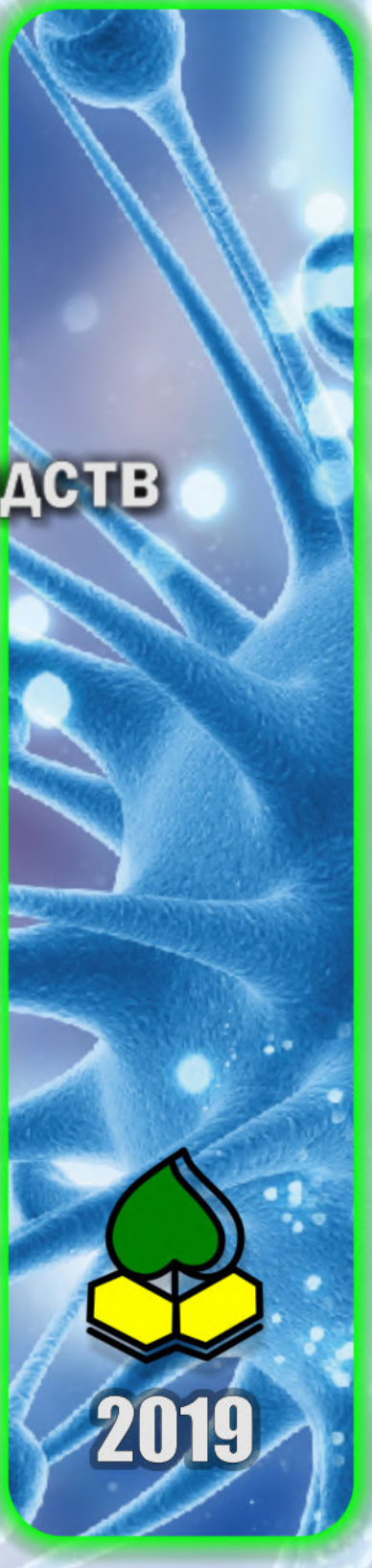
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Российская академия наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

«Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства»



СБОРНИК ТРУДОВ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

2019

II Международная научная конференция
«Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства»

по направлению
«Метаболомика и качество жизни»

Организаторы конференции:

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Российская академия наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

6 – 7 июня 2019 г., ФГБНУ ВИЛАР

г. Москва

ISBN 978-5-87019-086-0

УДК 633.88:615.45: 615.3:577:57.04

ББК: 42: 52.8: 24.2: 24.4.

Председатель редакционного совета: Сидельников Н.И.

Редакционный совет:

Быков В.А. академик РАН, д.т.н., профессор

Савченко И.В. академик РАН, д.б.н.

Мизина П.Г. д.фарм.наук, профессор

Морозов А.И. д.с.-х.н.

Осипов В.И. д.б.н.

Савин П.С. к.б.н.

Сайбель О.Л. к.фарм.н.

Семкина О.А. к.фарм.н.

Ферубко Е.В. к.мед.н.

Хазиева Ф.М. к.б.н.

Ответственные секретари:

Бабенко А.Н. к.б.н., Дыдыкина А.А.

Материалы публикуются в авторской редакции

© ВИЛАР, 2019-06

© Коллектив авторов

данлы, Е.А. Ситникова 411

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЯ МЯТЫ ЛУГОВОЙ (MENTHA ARVENIS L.) И ТЕХНОЛОГИЯ ЕГО ВЫРАЩИВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ГРУЗИИ.

Т.И. Иосебидзе, М.Н. Убирия, М.Г. Куридзе 416

СЕЛЕКЦИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА НУТРИЕНТНУЮ ЦЕННОСТЬ ЛИПИДОВ СЕМЯН

Я.Н. Демурин, О.М. Борисенко, Т.М. Перетягина 420

МОБИЛИЗАЦИЯ АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ВОПРОСЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ КРАПИВЫ (*URTICA DIOICA* L.) В БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

В.И. Чернявских, Е.В. Думачева, Д.В. Думачев 426

СОЗДАНИЕ УСЛОВИЙ *IN VITRO* ДЛЯ МОБИЛИЗАЦИИ У РЕГЕНЕРАНТОВ *BETA VULGARIS* L. АДАПТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ К ИОННОМУ СТРЕССУ

Н.Н. Черкасова, Е.О. Колесникова 431

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТОЙКОСТЬ *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ. К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

О.И. Боднар, В.В. Грубинко 436

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВОДНО-ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕВЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ СТАНДАРТИЗАЦИЯ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА

М.В. Воронков, В.А. Волков, В.М. Мисин 443

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В ЭКСТРАКТЕ ТРАВЫ *ASTRAGALUS PHYSODES* L.

М.У. Сергалиева, М.А. Самотруева, Д.А. Ахадова, Э.И. Абдулкадырова, А.С. Муканалиева, Ж.К. Кайырова 450

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ ПАПАЙИ (*CARICA PAPAYA* L.)

Р.И. Нугуманова, Н.В. Кудашкина 455

ЛЕТУЧИЕ СОЕДИНЕНИЯ НАСТОЙКИ ГОМЕОПАТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ КИРКАЗОНА ОБЫКНОВЕННОГО (*ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.)

УДК: (582.263+581.151):577.118

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТОЙКОСТЬ *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ. К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Боднар О. И.
к.б.н., преподаватель кафедры общей биологии, ТНПУ (Тернополь, Украина)
e-mail: bodnar_oi@yahoo.com
Грубинко В. В.
д.б.н., проф., заведующий кафедрой общей биологии, ТНПУ (Тернополь, Украина)

Аннотация: показано, что уровень генетического полиморфизма популяций *Ch. vulgaris* (Dj – 0,206-0,300) при воздействии солей селена, цинка и хрома, установленный с помощью ISSR- и IRAP-ПЦР, находится в пределах уровня генетического полиморфизма одноклеточных зеленых водорослей, выращенных в естественных условиях без добавления солей-регуляторов метаболизма.

Ключевые слова: хлорелла, *микроэлементы (селен, цинк, хром), ISSR- и IRAP*-праймеры, *ПЦР, генетический полиморфизм.*

ВВЕДЕНИЕ

Современный интерес к потенциальным коммерческим соединениям из микроводорослей актуализирует необходимость выяснения механизмов повышения их стрессоустойчивости, увеличение производительности, интенсификации метаболизма и активации тех или иных биосинтетических процессов с целью получения востребованных соединений.

Наряду с биохимическими методами регуляции, активно развиваются генетические методы трансформации метаболизма, в основе которых лежит изучение генома водорослей, экспрессии соответствующих генов и образования новых генномодифицированных штаммов. Именно за счет манипуляций с отдельными регуляторными генами успешными оказались попытка повысить выработку жирных кислот у диатомовых водорослей *Cyclotella cryptica* путем надэкспресии ядерного гена, кодирующего пластидную ацетил-СоА-карбоксилазу [1], и трансформация автотрофных микроводорослей в гетеротрофные, у которых при этих условиях повышается биосинтез триацилглицеролов. Вместе с тем, осуществление генетически детерминированных регуляции и контроля метаболизма является процессом чрезвычайно сложным и трудоемким, так как во многих случаях могут изменятся посттранскрипционные и посттрансляционные эффекты.

Известно, что активными регуляторами метаболизма являются как физические (температура, освещенность), так и химические (количество и соотношение отдельных частей или введение дополнительных количеств микроэлементов, прежде всего солей металлов) факторы среды выращивания. Поэтому подбор оптимальных концентраций и комбинаций металлов для биотехнологического культивирования *Ch. vulgaris* с целью моделирования ее метаболического статуса является актуальным с точки зрения возможных генотипических

изменений, как положительных, так и отрицательных.

Хлорелла – классический объект широко используется как для альгологических клеточных и молекулярных исследований, так и для получения полезных продуктов в аквакультуре благодаря быстрому размножению и неприхотливости условий выращивания [2, 3].

Одними из самых эффективных инструментов исследования генетического полиморфизма, благодаря своей простоте, высокой чувствительности и скорости проведения исследований, являются методы молекулярно-генетического анализа на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 5] с использованием мультилокусных генетических ISSR-маркеров и IRAP- маркеров (последовательности консервативных участков ретротранспозонов). Использование различных типов ПЦР-маркеров в генетическом анализе позволяет расширить спектр участков генома, отличающихся по функциональному значению.

Нами исследована культура *Chlorella vulgaris* в условиях воздействия повышенных концентраций в культуральной среде солей селена, цинка и хрома, которые, как показано ранее, являются активными регуляторами метаболизма липидов у хлореллы и способны включаться в их структуру с образованием биологически активных соединений – перспективных лечебно-профилактических препаратов при коррекции ожирения и диабета 2-го типа [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на микропопуляции культуры *Chlorella vulgaris* Beij. CCAP-211/11в, выращенной в среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горхема №11 при температуре 22–25^{0}C и освещении 2500 лк 16/8 ч. **В эксперименте к культуре водорослей добавляли водный раствор селенита натрия из расчёта на** Se (IV) – 10,0 мг/дм^3, и водные растворы $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ **из расчёта на** Zn^{2+} и Cr^{3+} – по 5,0 мг/дм^3. Биомассу живых клеток отбирали после семи суток культивирования.

ДНК выделяли по стандартному протоколу из биомассы водорослей, высушенной при температуре 37°C [7]. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик МС2». Реакционная смесь содержала 0,2 ммоль dNTP, 1,25 U Taq-полимеразы, 0,5 мкм праймера, 1 × ПЦР-буфер на $(NH_4)_2SO_4$ с 2,5 мМ $MgCl_2$. Для проведения ПЦР использовали следующие температурные режимы: ISSR-ПЦР: 94°C – 2 мин., 35 циклов (94°C – 30 с, 53°C – 30 с, 72°C – 1,5 мин.), 72°C – 2,5 мин; IRAP-ПЦР: 94°C – 2 мин., 35 циклов (94°C – 30 с; 58°C – 30 с; 72°C – 1,5 мин.), 72°C – 2,5 мин. Продукты амплификации геномной ДНК разделяли электрофорезом на 1,3% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1×SB-буфере в течение 5-6 ч при напряженности электрического поля 4-5 В/см. Для определения длины фрагментов использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder), содержащий фрагменты ДНК следующих размеров: 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1500; 3000 п.н. Обработку электрофореграмм проводили с помощью программы TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics). Генетические расстояния Жаккарда (D_J) между опытными образцами и контролем определяли в программе FAMD 1.25 [5].

Для проведения экспериментальных исследований использованы реактивы фирм «Sigma», «Lachema», «Reanal» и «Химреактив» (квалификация «ч.д.а.»).

Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общее количество фрагментов для всех образцов, которые синтезировались при использовании 7 ISSR- и 1 IRAP-маркера (табл. 1), составила 109 фрагментов, 42 из которых оказались полиморфными (38,5%). При этом праймер ISSR-840 показал наивысшую степень полиморфизма – 81%, а ISSR-04 – наименьшую 7,7%. В работе [8] показано, что доля полиморфных ампликонов для четырех клонов *Ch. vulgaris* при стандартных условиях культивирования составляла 39,6%, что сопоставимо с полученными нами данными при влиянии исследованных микроэлементов.

Таблица 1. – Характеристика ПЦР-продуктов *Ch. vulgaris*, полученных при использовании ISSR- и IRAP- ПЦР

	Праймер	Общее количество ампликонов	Количество полифморных ампликонов
1	**ISSR-03**	15	7
2	**ISSR-04**	13	1
3	**ISSR-05**	10	1
4	**ISSR-23**	17	7
5	**ISSR-807**	13	1
6	**ISSR-836**	11	7
7	**ISSR-840**	21	17
8	**IRAP-642**	8	1
		109	42

Использованные праймеры обеспечивали амплификацию фрагментов в пределах: 180-2600 п.н. (ISSR-ПЦР), 190-3400 п.н. (IRAP-ПЦР). Следует отметить, что в исследованиях при определении генетического полиморфизма в *Chlorella vulgaris* и *Chlorella pyrenoidosa* с помощью ISSR-праймеров полученные похожие результаты размеров продуктов ПЦР-реакции – 200-2600 п.н. [4].

Также определено значение показателя генетических дистанций по Жаккарду (Dj) между образцами культуры *Ch. vulgaris*, полученной при выращивании на средах различного состава (с добавлением солей Селена, Цинка и Хрома) и контролем (водоросли, выращенные при стандартных условиях культивирования) (табл. 2).

Показано, что наибольшей степенью от контроля отличался образец культуры *Ch. vulgaris*, выращенной с добавлением селенита натрия и хлорида хрома, а меньше всего – образец культуры *Ch. vulgaris*, выращенной с добавлением селенита натрий вместе с сульфатом цинка.

Таблица 2 – Генетические дистанции по Жакарду, рассчитанные на основе данных ПЦР-анализа

	1	**2**	**3**	**4**
контроль	–			
Se (IV)	0,232	–		
Se(IV) + Zn(II)	0,206	0,216	–	
Se(IV) + Cr(III)	0,300	0,148	0,298	–

1 – контроль; 2 – водоросли, выращенные с добавлением селенита натрия, Se (IV) – 10,0

мг/дм^3; 3 – водоросли, выращенные с добавлением Se (IV) – 10,0 мг/дм^3 и сульфатом цинка, Zn (II) – 5,0 мг/дм^3; 4 – водоросли, выращенные с добавлением Se (IV) – 10,0 мг/дм^3 и хлоридом хрома, Cr (III) – 5,0 мг/дм^3.

Отметим, что при культивировании *Ch. vulgaris* в среде с селенитом натрия, Dj составила 0,232 по отношению к контролю. В то же время, при добавлении в среду, кроме селенита натрия, дополнительно сульфата цинка, этот показатель снижался на 12% (табл. 2). Можно предположить, что Цинк определенным образом модулирует и контролирует накопление генетических изменений в культуре водоросли, поскольку их количество ниже, чем в образце, культивированном только с селенитом натрия. Кроме этого, Shen и соавт. показали, что при физиологических условиях культивирования генетические расстояния по Жаккарду между четырьмя штаммами *Ch. vulgaris* также варьировали в пределах от 0,218 до 0,321, а между тремя штаммами *Chlorella pyrenoidosa* – от 0,190 до 0,275 [4].

Согласно литературным данным, микросателлиты эволюционируют быстрее, чем остальная часть ДНК, в том числе поддаваясь «динамическим мутациям», что, в свою очередь, приводит к появлению аллелей с разным количеством повторяющихся единиц [8]. Поэтому, дополнительное внесение микроэлементов в среду культивирования, а затем их проникновение в клетку и включение в состав внутриклеточных структур, может привести к возникновению изменений в генетическом аппарате клетки, что проявляется увеличением уровня генетического полиморфизма *Ch. vulgaris*. По всей вероятности, полученные нами результаты молекулярно-генетического исследования хлореллы свидетельствуют об отсутствии негативного влиянии солей Селена, Цинка или Хрома. Они лишь вызывают определенные изменения, которые в такой же степени проявляются и в пределах нормы [4]. Эти изменения обусловленные, по-видимому, активацией или инактивацией соответствующих биохимических процессов или физиологических функций в клетках *Ch. vulgaris* при действии микроэлементов [6].

Следует отметить, что биологическая активность соединений селена в клетках прямо или косвенно связана с протеинами: селенцистеином, селенметионином, глутатионпероксидазой, тиоредоксинредуктазой, селенпротеином Р и т.д. Надлежащее количество селена в составе этих соединений обеспечивает нормальное направление каскада процессов защиты ДНК и хромосом от «поломки», разрывов, делеций, образования аддуктов. Защитные эффекты селена также были показаны на митохондриальной ДНК, а именно: положительное влияние микроэлемента на длину и функцию теломер. Соединения селена в определенной степени могут иметь отношение к экспрессии генов, осуществлять модуляции метилирования ДНК или торможения деацетилирования гистонов протеинов [9]. Кроме этого, замечено дополнительную протекторную функцию селена на генетический аппарат клеток через селенметионин-индуцированную реакцию репарации ДНК, а также увеличение активности репаративных ферментов – ДНК-гликозилаз.

Наиболее заметное влияние соли цинка на ДНК наблюдается в функционировании так называемых «цинковых пальцев», которые являются протеиновыми модулями, стабилизированные одним или двумя ионами цинка и соединенные координационными связями с аминокислотными остатками белков. Эти цинксодержащие протеины являются наиболее распространенными протеинами в геномах эукариот, выполняя чрезвычайно разнообразные функции – распознавание ДНК, упаковку РНК, активацию транскрипции, регуляцию апоптоза, формирование пространственной структуры протеина и связывание липидов [10]. Исследование этой группы протеинов показали их активное участие в ответных реакциях клеток на биотические и абиотические стрессовые факторы.

Вопрос физиологической активности солей хрома до сих пор остается спорным и от-

крытым, и прежде всего будет зависеть от видовой принадлежности и генотипа организма [11]. В неподходящих концентрациях хром, попадая в организм, проявляет канцерогенное воздействие с существенным нарушением метаболизма и сложным механизмом мутагенеза, причем доказано, что Cr (III) менее опасен, чем Cr (VI). Однако, для животных и человека ключевая роль хрома состоит в регуляции углеводного обмена, поскольку Cr (III) является компонентом фактора толерантности к глюкозе. Поэтому, хром в соответственных концентрациях крайне важен для улучшения качества жизни больных с сахарным диабетом, и использование соединений хрома с лечебной или профилактической целью требует четкой и однозначной инструкции по его форме и дозе.

ВЫВОДЫ

Установлено, что между контрольным образцом *Ch. vulgaris* и образцом, выращенном при совместном воздействии селенита натрия и сульфата цинка, показатель генетической дистанции по Жаккарду был наименьшим (0,206). Можно предположить, что этот микроэлемент определенным образом модулирует и контролирует накопление генетических изменений в культуре водоросли, что является подтверждением важного биологического значение цинка.

Таким образом, дополнительное внесение солей микроэлементов (селена, цинка, хрома) в среду культивирования осуществляет вызывает определенную модификацию генетического аппарата клеток *Chlorella vulgaris*, однако обнаруженные изменения находятся в пределах уровня генетического полиморфизма одноклеточных зеленых водорослей, выращенных в естественных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunahay T. G., Jarvis E. E., Roessler P. G. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1996; 57 – 58: 223 – 231.
2. Liu J., Hu Q. Chlorella: Industrial production of cell mass chemicals // In *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology*. – 2013; 339 – 349.
3. Grubinko V.V., Bodnar O.I., Lutsiv A.I., Viniarska G.B. Adaptive role of lipids in algae under metal ions impact//Hydrobiol. J. – 2018; 54 (6): 78 – 93.
4. Shen S. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* // Chin. J. Oceanol. Limnol. – 2008; 26 (4): 380 – 384.
5. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Mol. Ecol. Notes. – 2006; 6 (2); 569 – 572.
6. Bodnar O.I., Kovalska H.B., Grubinko V.V. Regulation of biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* by compounds of zinc, chromium and selenium // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2018; 9 (2): 267 – 274.
7. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985; 5: 69 – 76.
8. Wongsawad P., Peerapornpisal Y., Wongsawad C. Molecular characterization of spirogyra from Northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR) // J. Adv. Biol.

Biotechnol. (JABB). – 2015; 3 (2): 144 – 153.

9. Ferguson L. R., Karunasinghe N., Zhu S., Wang A. H. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability // Mutat. Res. – 2012; 733 (1-2): 100 – 110.
10. Laity J. H., Lee B. M., Wright P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2001; 11 (1): 39 – 46.
11. Cervantes C., Campos-Garc J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J. C., Moreno-Sanchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants //FEMS Microbiol. Rev. – 2001; 25: 335 – 347.

GENETIC RESISTANCE OF *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ. UNDER THE ACTION OF SOME MICROELEMENTS.

Bodnar O.I.
PhD (Biol.), Senior Researcher, Department of general Biology, TNPU (Ternopil, Ukraine), *e-mail: bodnar_oi@yahoo.com*
Grubinko V.V.
Doctor of science (Biology), professor, Head of the Department of General Biology, TNPU (Ternopil, Ukraine)

Summary: We have shown that the level of genetic polymorphism of *Ch. vulgaris* (Dj – 0.206-0.300) under the action of sodium selenite separately and together with zinc sulfate and chromium chloride using ISSR- and IRAP-PCR is within the level of genetic polymorphism of unicellular green algae grown under natural conditions.

Key words: *chlorella, trace elements (selenium, zinc, chromium), ISSR and IRAP primers, PCR, genetic polymorphism.*