

- 5 Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Дугина Т.О. Цитологическое подтверждение спорофитного развития микроспор в культуре пыльников тритикале без холодового воздействия // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 5. – С. 61-65.
- 6 Prakash J., Giles K.L. Induction and growth of androgenic haploids // Intern. Rev. Cytol. – 1987. – Vol. 107. – P. 273–292.
- 7 Clapham P. Haploid Hordeum plants from anthers in vitro // Z. Pflanzenzucht. – 1973. – Vol. 69. – P. 142–155.
- 8 Foroughi_Wehr B., Friedt W., Wenzel G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in
4 *Hordeum vulgare* L. // Theor. Appl. Genet. – 1982. – Vol. 62. – P. 233–239.
- 9 Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // Agricult. and Food Sci. Fin. – 1998. – Vol. 6. – P. 389–398.
- 10 Круглова Н.Н., Куксо П.А. Начальный этап индукции андроклинии // Успехи соврем. биол. 2006. Т. 126. № 5. С. 462-471.
- 11 Aditya P. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid production in triticale x wheat and triticale x triticale hybrids. / P. Aditya, S. Gurdeep, S. Harinder // Euphytica. 2006. V.150, № 3. P. 339-345.
- 12 Нуржанова А.А., Сариев Б.С., Тохетова Л.А., Жунусова Ж.С., Ораз С., Кашкеев Диагностика солеустойчивости ячменя на ранних этапах онтогенеза // The International scientific conference “Breeding and genetic of agricultural crops: traditions and prospects” – 2012 Odessa. Ukraine. – С.181-182.
- 13 Gamborg O.L.6 Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J.Biochem. – Vol. 110, 1968. – P.95.
- 14 Удольская Н.Л. Введение в биометрию. – Алма-Ата, 1976. – 84 с.

УДК 579:222

С.Б. Оразова*, Б.Қ. Қайрат, Т.А. Карпенюк, С.А. Джокебаева, А.В. Гончарова,
Я.С. Цуркан, Б. Азимханова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

Изучение влияния плотности инокулята и продолжительности культивирования на ростовые характеристики и содержание липидов в клетках зеленых микроводорослей

Определены особенности ростовых процессов и синтеза липидов культурами зеленых микроводорослей *Oocystis rhomboideus*, *Scenedesmus obliquus*, *Dictyochlorella globosa* в зависимости от времени культивирования и плотности посева клеток. Установлено, что уменьшение начальной плотности посева культуры увеличивает значение ростового индекса, удельной скорости размножения, уменьшает время удвоения клеток, увеличивает темпы прироста биомассы, но не оказывает достоверного влияния на динамику выхода и содержание липидов суммарной фракции (в расчете на 100 г сухого веса клеток).

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, динамика роста, липиды.

S.B. Orazova, B. Kayrat, T.A. Karpenyuk, S.A. Dzhokebaeva, A.V. Gonsharova,
Ya. Tzurkan, B. Azimkhanova

Study of the influence of inoculum density and duration of cultivation of the growth characteristics and lipid content in the cells of green microalgae

Specifies the peculiarities of growth processes and synthesis of lipids cultures green microalgae *Oocystis rhomboideus*, *Scenedesmus obliquus*, *Dictyochlorella globosa* depending on the time of cultivation and density of cells. It is established that the decrease of the initial density of the culture increases the value of the growth index, specific reproduction rate, reduces the time of doubling the cells, increases the rate of growth of biomass, but does not exert significant influence on the dynamics of the output of the lipid fraction.

Keywords: green microalgae, the growth dynamics, lipids.

С.Б. Оразова, Б.Қ. Қайрат, Т.А. Карпенюк, С.А. Джокебаева, А.В. Гончарова,
Я.С. Цуркан, Азимханова Б.

Инокулят тығыздығы мен культивирлеу ұзақтығының жасыл микробалдыр клеткаларының липидтер мөлшері мен өсу көрсеткіштеріне әсері

Oocystis rhomboideus, *Scenedesmus obliquus*, *Dictyochlorella globosa* жасыл микробалдыр культуралары культивирлеу уақыты мен клеткаларды егу тығыздығына тәуелді өсу процестері мен липидтер синтезінің ерекшеліктері анықталды. Бастапқы егу тығыздығының төмендігі өсу индексі мәні мен меншікті өсу жылдамдығын арттыратындығы, клеткалардың екі еселену уақытын қысқартатындығы анықталды. Егу тығыздығының төмен болуы биомассаны жинақтау қарқындылығын жоғарылатқанымен, липидтердің суммарлық фракциялары (клеткалардың 100 г құрғақ массасына шаққанда) мөлшері мен шығу динамикасына анық әсер тигізбейтіндігі белгілі болды.

Түйін сөздер: жасыл микробалдырлар, өсу динамикасы, липидтер.

Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3/1(59). 2013

Специфика метаболизма представи-телей микроальгофлоры, связанная с продуцированием метаболитов с ценными для человека свойствами, сделала микроводоросли одним из важных объектов биотехнологии. Их используют в производстве фармакологически активных препаратов, продуктов для косметических аппликаций и т.д. Одним из важнейших компонентов органического вещества микроводорослей являются липиды, в значительной степени определяющие их структурно-функциональные особенности и энергетический потенциал. При определенных условиях культивирования некоторые виды микроводорослей могут накапливать до 80 % липидов от сухого веса, что превышает содержание липидов у большинства масличных зерновых культур. Некоторые микроводоросли характеризуются способностью накапливать высокие уровни полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), ценных для человека и животных [1]. Они являются не только структурными компонентами липидов клеточных мембран, липопротеидных комплексов головного и спинного мозга, сердца, печени и других органов, но и предшественниками целого ряда их биологически важных метаболитов – простагландинов, циклопентенонов, простацклинов, тромбоксанов, лейкотриенов, липоксинов, гепоксилинов, соединений с антибактериальной активностью и т.д. [2-4]. Одним из биотехнологических приемов, позволяющих повысить содержание липидов в биомассе микроводорослей является оптимизация условий их культивирования.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись три вида зеленых микроводорослей - *Oocystis rhomboideus*, *Scenedesmus obliquus*, *Dictyochlorella globosa*, характеризующиеся стабильным ростом в лабораторных условиях. Водоросли культивировали в накопительном режиме, при 16-часовом фотопериоде. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 20 - 25°C. В качестве питательной среды использовали среду Фитцджеральда [5]. Выращивали микроводоросли в 250-миллилитровых конических колбах. Объем среды в колбах составлял 80 мл при высоте слоя раствора 5 см. Для определения динамики прироста биомассы в начале и конце опыта определяли сухую массу инокулята и полученной из него культуры, а также оптическую плотность культуры в день посева (D_0) и в день снятия опыта (D_k) при 750 нм. Для определения сухой биомассы бюксы высушивали при 105°C до постоянного веса сухого остатка. Из массы бюкса с сухим остатком вычитали массу пустого бюкса. Увеличение концентрации клеток параллельно определяли методом прямого счета в камере Горяева проб суспензий водорослей сразу после посева и в конце срока культивирования. Определение прироста биомассы проводили путем вычисления коэффициента размножения по формуле [6]:

$$KP = \frac{M_2}{M_1}, \quad (1)$$

где, M_2 – сухой вес биомассы в конце опыта (конечная концентрация клеток),

M_1 - сухой вес посевного материала (начальная концентрация клеток).

Для определения интенсивности роста культур использовали коэффициент «Ростовой индекс», который вычисляли по формуле [6]

$$PI = D_k - D_0 / D_0 \quad (2)$$

Для перехода от единиц оптической плотности к величине абсолютно сухого веса (АСВ) использовали коэффициент $k = 0,78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед.опт.плотн.}^{-1}$, т.е. $АСВ = k \cdot D_{750}$ [7].

Удельную скорость роста определяли по формуле [7]:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}, \quad (3)$$

где X_2 и X_1 – биомасса во время t_2 и t_1 , соответственно.

Время удвоения популяции клеток рассчитывали по формуле [8]:

$$d.t. = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

Экстракцию липидов из клеток микроводорослей осуществляли по модифицированному методу Блайя и Дайэра [9]. Клетки водорослей подвергали сухо-воздушной сушке, в пробах весом 0,1-0,2 г предварительно дезактивировав ферменты изопропиловым спиртом при температуре 80°C в течение 15 минут. Затем пробы гомогенизировали смесью хлороформ-метанол (1:1) в течение 30 мин, центрифугировали для осаждения клеток и декантировали липиды. Процедура повторялась до

получения безцветного раствора. После удаления хлороформ-метанольной смеси проводилось гравиметрическое определение выделенных липидов.

Результаты и их обсуждение

Важное значение для начала интенсивного роста популяции после посева культуры имеет плотность посева (количество внесенных клеток на мл среды культивирования). С целью определения оптимальной плотности посева были проведены соответствующие опыты на культурах зеленых протококковых водорослей *Dictyochlorella globosa*, *Oocystis rhomboideus*, *Scenedesmus obliquus*. Суспензии водорослей, предназначенные для посева культивировали в течение 7 дней. Затем клетки осаждали центрифугированием, методом разведений готовили суспензии для проведения подсчета концентрации клеток в камере Горяева. В колбы со свежей питательной средой вносили неразбавленный инокулят до конечной концентрации клеток $1 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$.

На рисунке 1-3 показаны ростовые кривые, полученные за 20 дней культивирования для каждого из вариантов разведения культур зеленых протококковых водорослей.

Как показывают данные, представленные на рисунках 1-3, независимо от количества внесенных в среду клеток рост в культурах в первые 2-4 дня идет медленно, что характерно для лаг-фазы. В последующие дни в культурах с исходным содержанием клеток $5 \cdot 10^6$ и $10 \cdot 10^6$ ростовые процессы усиливаются, а культуры с исходной концентрацией клеток $1 \cdot 10^6$ характеризуются быстрым приростом биомассы. Ростовый индекс в культурах при начальной концентрации клеток $1 \cdot 10^6$ в несколько раз превышает значения ростового индекса в культурах с повышенной начальной концентрацией клеток. По величине значений ростового индекса (РИ) при начальной концентрации клеток $1 \cdot 10^6$ культуры располагаются в ряд *Oocystis rhomboideus* > *Scenedesmus obliquus* > *Dictyochlorella globosa*. Так, к 10-му дню культивирования РИ в варианте $1 \cdot 10^6$ в культуре *Oocystis rhomboideus* достиг значения $33,1 \pm 2,7$. В других вариантах, где концентрация клеток, внесенных в среду при посеве была выше, ростовой индекс составил $20,6 \pm 1,3$ ($5 \cdot 10^6$) и $15,4 \pm 1,5$ ($10 \cdot 10^6$). К этому сроку культивирования РИ в варианте $1 \cdot 10^6$ в культуре *Dictyochlorella globosa* достиг значения $7,0 \pm 0,7$. В других вариантах, где концентрация клеток, внесенных в среду при посеве была выше, ростовой индекс составил $2,7 \pm 0,5$ ($5 \cdot 10^6$) и $1,5 \pm 0,3$ ($10 \cdot 10^6$).

Известно, что в стационарной фазе происходит замедление роста, связанное с истощением источников азота из среды, что способствует большему накоплению липидов: при постоянной концентрации клеток, происходит увеличение содержания липидов, что характерно для накопительного режима культивирования микроводорослей. Культуры клеток выходят в стационарную фазу роста на 18 сутки культивирования. Однако, достоверных изменений в накоплении липидов к 20-м суткам культивирования микроводорослей выявлено не было.

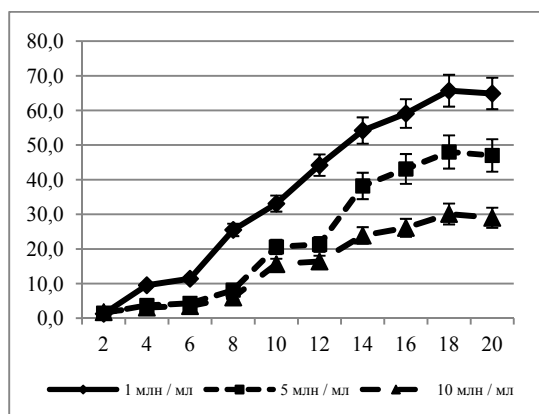
Ростовой индекс, являясь условным коэффициентом, показывает во сколько раз увеличилась за определенный промежуток времени исходная биомасса культуры. Для характеристики интенсивности роста популяций в заданных условиях были использованы показатели μ (удельная скорость роста) и d.t. (doubling time - время удвоения) [8]. Данные по расчету этих показателей представлены в таблице 1.

Представленные результаты подтверждают, что культуры зеленых водорослей с начальным количеством клеток $1 \cdot 10^6$ растут с большей скоростью, чем культуры с повышенной плотностью посева, минимальное время удвоения характерно для культуры *Oocystis rhomboideus* (2,79 суток / г). Однако рост популяции хотя и идет быстрыми темпами, но продуктивность этого варианта к 20-м суткам ниже, чем в других вариантах.

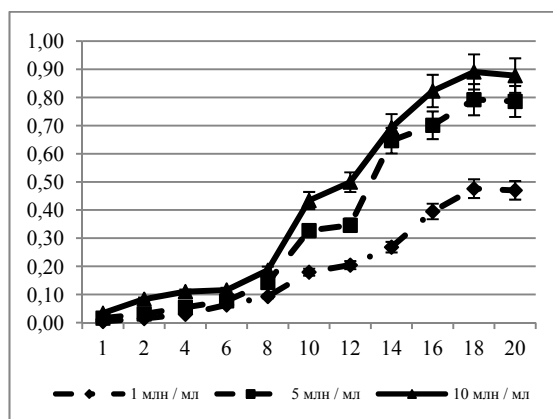
Было проведено определение содержания общих липидов в культуре зеленых микроводорослей в динамике их роста, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Ростовые характеристики зеленых микроводорослей на 20 сутки культивирования при различной плотности инокулята

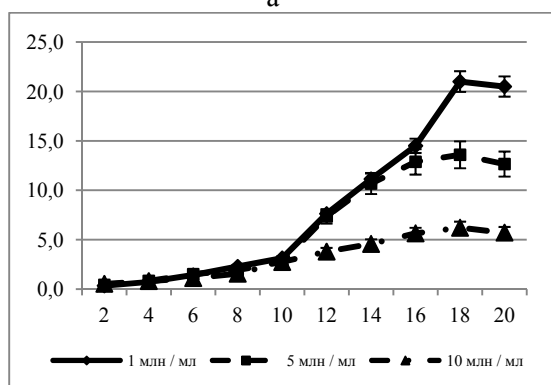
Вид микроводорослей	Удельная скорость роста, (г / сутки)			Время удвоения, (сутки / г)		
	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$10 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$10 \cdot 10^6$
<i>Dictyochlorella globosa</i>	0,17	0,09	0,06	3,97	7,88	11,42
<i>Oocystis rhomboideus</i>	0,25	0,20	0,17	2,79	3,39	4,04
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,19	0,15	0,13	3,7	4,52	5,33



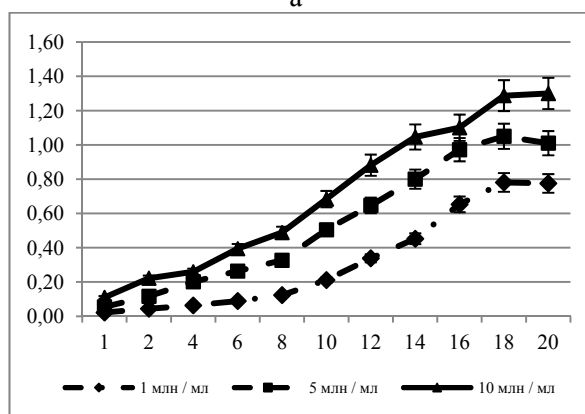
а



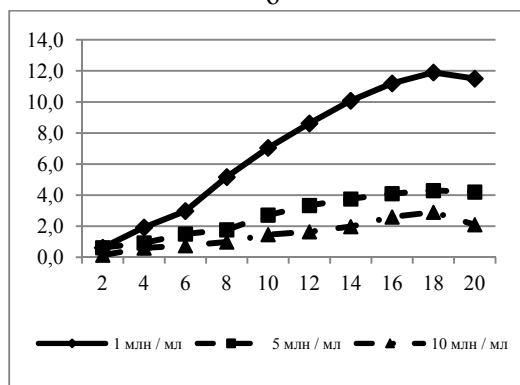
а



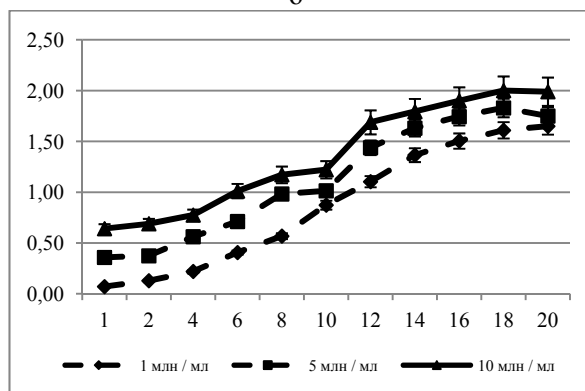
б



б



в



в

По оси ординат – значения РИ, условные единицы; по оси абсцисс – длительность культивирования, сутки

По оси ординат – значения АСВ, г; по оси абсцисс – длительность культивирования, сутки

Рисунок 1 – Ростовой индекс в культуре *Oocystis rhomboideus* (а), *Scenedesmus obliquus* (б), *Dictyochlorella globosa* (в) при различной плотности посева культуры

Рисунок 2 – Абсолютно сухой вес в культуре *Oocystis rhomboideus* (а), *Scenedesmus obliquus* (б), *Dictyochlorella globosa* (в) при различной плотности посева культуры

Таблица 2 – Влияние плотности посева на содержание общих липидов (г/100 г сухого веса) в разные сроки культивирования у зеленых протококковых водорослей

Количество клеток в 1 мл культуры	Время культивирования, сутки			
	5	10	15	20
	<i>Oocystis rhomboideus</i>			
1	2	3	4	5
$1 \cdot 10^6$	$20,75 \pm 4,5$	$23,20 \pm 1,7$	$26,46 \pm 2,5$	$28,44 \pm 4,5$

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
5*10 ⁶	21,48±2,4	22,47±0,7	25,48±4,8	29,21±2,5
10*10 ⁶	20,05±1,1	21,00±1,3	23,0±1,3	29,27±0,1
<i>Dictyochlorella globosa</i>				
1*10 ⁶	18,01±0,9	20,09±3,1	22,01±2,9	24,1±2,4
5*10 ⁶	16,23±1,8	21,28±0,9	22,5±1,9	23,11±1,7
10*10 ⁶	16,67±1,9	21,56±1,5	21,9±2,2	22,62±2,8
<i>Scenodesmus obliquus</i>				
1*10 ⁶	15,3±1,1	14,01±0,9	17,10±1,4	19,30±0,7
5*10 ⁶	16,07±1,5	15,05±1,8	16,1±2,1	18,7±1,9
10*10 ⁶	15,58±0,5	14,11±0,6	15,3±1,1	17,4±2,1

Анализ результатов показал, что в динамике роста культур микроводорослей содержание общих липидов растет. Достоверной разницы в динамике накопления липидов при росте культур с разной начальной плотностью посева не выявлено.

Литература

- 1 Басова М.М. Жирнокислотный состав липидов микроводорослей. - Севастополь: ИБЮМ НАНУ, 2003. – С. 3-7.
- 2 Faroouqi A. A. et al. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvements in neurological disorders // Chem. Phys. Lipids. – 2000. – V. 106. № 1. – P. 1–29.
- 3 Назаров П.Е., Мягкова Г.И., Гроза Н.В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т. 4. № 5. - С. 3-19.
- 4 Пульц О. Ценные вещества из водорослей // Альгология. – 2000. – Т. 10. -№ 3. – С. 344-348.
- 5 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. - 245 с.
- 6 Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях минерального питания // Экология моря. – 2001. – Вып.56. – С. 41-46.
- 7 Тренкеншу Р.П., Геворгиз Р.Г., Боровков А.Б. Основы промышленного культивирования Дуналиеллы солонководной (*Dunaliella salina* Teod.). – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 103 с.
- 8 KsanT.G., Zekerüyaoulu A.L., Ak I. The Growth of *Spirulina platensis* in Different Culture Systems Under Greenhouse Condition // Turk. J. Biol. – 2007. – № 31. – P. 47-52.
- 9 Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1957. – V.37. - №8. – P. 911-917

УДК 577.216.3, 577.218

А.М. Писаренко*, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Искаков

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: alena_pisarenko@inbox.ru

Получение растений картофеля, экспрессирующих транскрипционный фактор AtDREB2A

Целью работы является получение трансгенных растений картофеля, экспрессирующих транскрипционный фактор AtDREB2A в нативной и мутированной формах, для изучения молекулярных механизмов устойчивости растений к засухе.

Аmplифицирован фрагмент ДНК, кодирующий ген транскрипционного фактора AtDREB2A из *Arabidopsis thaliana*, и проведен делеционный мутагенез кодирующей последовательности с целью получения конститутивно активного белка. Обе последовательности клонированы под контроль конститутивного 35S-промотора вируса CaMV и индуцибельного промотора rd29A, а также различных вариантов усилителей трансляции. Полученные трансгенные растения, экспрессирующие ген AtDREB2A в нативной и мутированной формах, были проверены на устойчивость к засухе.

Ключевые слова: фактор транскрипции, AtDREB2A, засуха, картофель.

А.М. Pisarenko, R.M. Nargilova, O.V. Karpova, B.K. Iskakov

Obtaining of potato plants that express transcriptional factor AtDREB2A

The aim of the work is to obtain of transgenic potato plants expressing transcriptional factor AtDREB2A, in intact and mutated form, for studying of the molecular mechanisms of plants resistance to drought.