

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

ЧЕПЕЛЕВА
Елизавета Владимировна

**КАРОТИНОГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ**

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Н.В. Козел

Допущена к защите
«__» _____ 2020 г.
Зав. кафедрой клеточной биологии
и биоинженерии растений,
кандидат биологических наук, доцент
_____ И.И. Смолич

Минск, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 История обнаружения <i>Dunaliella salina</i>	10
1.2 Биология, морфология и таксономия <i>Dunaliella salina</i>	11
1.3 Пигментный состав клеток <i>Dunaliella salina</i>	13
1.4 Каротиноиды и пути их биосинтеза в живых системах	13
1.5 β -каротин	21
1.6 Условия, индуцирующие синтез β -каротина	23
1.6.1 Зависимость биосинтеза β -каротина от концентрации соли в среде	23
1.6.2 Зависимость биосинтеза β -каротина от интенсивности освещения, ультрафиолетового излучения и температуры	23
1.6.3 Синтез β -каротина при дефиците азота в среде	24
1.6.4 Синтез β -каротина при дефиците фосфора в среде	24
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1 Объект исследования	26
2.2 Условия культивирования микроводоросли <i>Dunaliella salina</i> и закладка опыта	26
2.3 Метод определения продуктивности микроводоросли <i>Dunaliella salina</i>	28
2.4 Количественное определение состава фотосинтетических пигментов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	29
2.5 Метод выделения РНК из клеток <i>Dunaliella salina</i>	31
2.6 Метод синтеза кДНК на матрице РНК	32
2.7 Метод расчета ДНК-праймеров	32
2.8 Проведение ПЦР-анализа	33
2.9 Определение фотосинтетической активности фотосистем клеток <i>Dunaliella salina</i> с помощью метода РАМ-флуориметрии	33

2.10 Реагенты, которые были использованы в работе	35
2.11 Статистическая обработка экспериментальных данных	35
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Каротиногенез в клетках <i>Dunaliella salina</i> и продуктивность водоросли при культивировании на средах, дефицитных по биогенным элементам	36
3.2 Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты фитинситазу (PSY), фитиндесатуразу (PDS) и ликопин- β -циклазу (LCY-b)	45
3.3 Оценка продуктивности и пигментного состава клеток <i>Dunaliella salina</i> при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности света	46
3.4 Влияние модификации состава питательной среды и интенсивности освещения на фотохимическую активность фотосистем клеток <i>Dunaliella salina</i>	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	57
ПРИЛОЖЕНИЕ А	61

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 69 страниц, 27 рисунков, 13 таблиц, 45 источников, 1 приложение.

МИКРОВОДОРОСЛИ, *DUNALIELLA SALINA*, КАРОТИНОГЕНЕЗ, β -КАРОТИН, ХЛОРОФИЛЛ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ФОТОСИСТЕМЫ, СТРЕСС, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, БИОГЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ.

Цель работы и ее актуальность заключается в изучение особенностей каротиногенеза, уровня экспрессии ключевых генов биосинтеза β -каротина, а также фотохимической активности фотосистем в клетках *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на средах, дефицитных по биогенным элементам (N, K+P).

Объектом исследования служила зеленая жгутиковая микроводоросль *Dunaliella salina* (штамм IBCE D-1) из коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Предметом исследования являлись пигментный состав, фотохимическая активность фотосистем и уровень экспрессии ключевых генов биосинтеза каротиноидов в клетках *Dunaliella salina* при воздействии дефицита N, а также K+P в питательной среде.

В процессе работы были получены следующие результаты: накопление β -каротина в условиях дефицита азота более эффективно, по сравнению с контролем, а также дефицитом калия и фосфора. При культивировании *Dunaliella salina* на средах, дефицитных по N и K+P, регистрируются повышенные уровни экспрессии генов *PSY*, *PDS*, *LCY*. Сочетанное действие дефицита биогенных элементов в питательной среде и света высокой интенсивности более эффективно по сравнению с действием только дефицита биогенов. Установлено преимущественное подавление активности ФС2 в клетках *Dunaliella salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, по сравнению с контролем и вариантом с дефицитом калия и фосфора, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β -каротина, как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности, синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС2.

Новизна полученных результатов заключается в том, что впервые изучены особенности каротиногенеза в клетках *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 и показана возможность получения биомассы этого штамма, обогащенной β -каротином, путем модификации условия культивирования.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 69 старонак, 27 малюнкаў, 13 табліц, 45 крыніц, 1 дадатак.

МІКРАВОВАДАРАСЦІ, *DUNALIELLA SALINA*, КАРАТЫНАГЕНЭЗ, β -КАРАТЫН, ХЛАРАФІЛ, ЭКСПРЭСІЯ ГЕНАЎ, ФОТАСІСТЭМЫ, СТРЭС, ПАЖЫЎНАЕ АСЯРОДЗЕ, БІЯГЕННЫЯ ЭЛЕМЕНТЫ.

Мэта працы і яе актуальнасць заключаецца ў вывучэнні асаблівасцяў каратынагенэза, ўзроўня экспрэсіі ключавых генаў біясінтэзу β -каратына, а таксама фотахімічнай актыўнасці фотосістэм у клетках *Dunaliella salina* штаму IBCE D-1 пры культываванні у пажыўным асяроддзі, дэфіцытным па біягенных элементах (N, K + P).

Аб'ектам даследавання служыла зялёная жгутыкавая мікравоводарасць *Dunaliella salina* (штам IBCE D-1) з калекцыі Рэспубліканскага цэнтра альгалогіі Інстытута біяфізікі і клетачнай інжынерыі НАН Беларусі.

Прадметам даследавання з'яўляліся пігментны склад, фотахімічная актыўнасць фотосістэм і ўзровень экспрэсіі ключавых генаў біясінтэзу каратыноідаў у клетках *Dunaliella salina* пры ўздзеянні дэфіцыту N, а таксама K + P у пажыўным асяроддзі.

У працэсе работы былі атрыманы наступныя вынікі: назапашванне β -каратыну ва ўмовах дэфіцыту азоту праходзіла больш эфектыўна, у параўнанні з кантролем, а таксама дэфіцытам калія і фосфару. Пры культываванні *Dunaliella salina* на асяроддзях, дэфіцытных па N і K + P, рэгіструюцца павышаныя ўзроўні экспрэсіі генаў *PSY*, *PDS*, *LCY*. Сумеснае дзеянне дэфіцыту біягенных элементаў у пажыўным асяроддзі і святла высокай інтэнсіўнасці больш эфектыўна ў параўнанні з дзеяннем толькі дэфіцыту біягенных элементаў. Устаноўлена пераважнае падаўленне актыўнасці ФС2 у клетках *Dunaliella salina*, якія культывавалі у пажыўным асяроддзі, дэфіцытным па азоту, у параўнанні з кантролем і варыянтам з дэфіцытам калія і фосфару, што можа быць ключавым фактарам запуску павышанага сінтэзу ў клетках водарасці β -каратыну, як антыаксіданта, які прадухіляе залішняе назапашванне ў хларапластах актыўных формаў кіслароду, у прыватнасці, сінглетнага малекулярнага кіслароду, генерацыя якога павялічваецца пры пашкоджанні кампанентаў або парушэнні функцыянавання комплексаў ФС2.

Навізна атрыманых вынікаў заключаецца ў тым, што ўпершыню вывучаны асаблівасці каратынагенэза ў клетках *Dunaliella salina* штаму IBCE D-1 і паказана магчымасць атрымання біямасы гэтага штаму, узбагачанай β -каратынам, шляхам мадыфікацыі ўмоў культывавання.

ABSTRACT

Diploma project 69 pages, 27 figures, 13 tables, 45 sources, 1 adjunct.

MICROALGAE, *DUNALIELLA SALINA*, CAROTINOGENESIS, β -CAROTIN, CHLOROPHYLL, EXPRESSION OF GENES, PHOTOSYSTEMS, STRESS, NUTRIENT MEDIUM, BIOGENIC ELEMENTS.

The purpose of the work and its relevance is to study the characteristics of carotenogenesis, the level of expression of key β -carotene biosynthesis genes, as well as the photochemical activity of photosystems in *Dunaliella salina* cells of strain IBCE D-1 when cultured in the nutrient medium with deficient in biogenic elements (N, K + P).

The object of the study was the green flagellated microalga *Dunaliella salina* (IBCE strain D-1) from the collection of the Republic Algological Center of the Institute of Biophysics and Cell Engineering of the NAS of Belarus.

The subject of the study was the pigment composition, photochemical activity of photosystems and the expression level of key carotenoid biosynthesis genes in *Dunaliella salina* cells under the influence of N deficiency, as well as K + P in the nutrient medium.

In the process, the following results were obtained: the accumulation of β -carotene in conditions without nitrogen is more effective compared with the control, as well as a deficiency of potassium and phosphorus. When culturing *Dunaliella salina* in the nutrient medium without N and K + P, increased levels of expression of the PSY, PDS, and LCY genes are recorded. The combined effect of a deficiency of nutrients in a nutrient medium and high-intensity light is more effective than the action of a deficiency of nutrients only. The predominant suppression of PS2 activity in *Dunaliella salina* cells cultured on a nitrogen-deficient medium was established compared with the control and the variant with potassium and phosphorus deficiency, which may be a key factor in triggering increased synthesis of β -carotene in algae cells as an antioxidant that prevents excessive accumulation of reactive oxygen species in chloroplasts, in particular, singlet molecular oxygen, the generation of which increases when the components are damaged or the functioning of the PS2 complexes is impaired.

The novelty of the obtained results lies in the fact that for the first time the features of carotenogenesis in *Dunaliella salina* cells of strain IBCE D-1 were studied and the possibility of obtaining biomass of this strain enriched with β -carotene by modifying the cultivation conditions was shown.