На правах рукописи

НЯМСУРЭН ЧУЛУУНЦЭЦЭГ

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МИКРОБНЫХ ГЕНОВ ФИТАЗ В РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в рамках Open Lab «Микробные биотехнологии».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, заведующая лабораторией агроэкологии и микробиологии, ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения» Россельхозакадемия,
Дегтярева Ирина Александровна

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией физиологии и генетики культивируемых клеток ФГБУН «Казанский институт биохимии и биофизики» Казанского научного Центра Российской академии наук
Румянцева Наталья Ивановна,

Ведущая организация: ФГБНУ, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской Академии сельскохозяйственных наук, г. Казань

Защита диссертации состоится «18 февраля 2016 г. в __ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, 74, аудитория 205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «___» ____________2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Фосфор играет важную роль во многих метаболических и энергетических процессах всех живых организмов и является важным источником питания животных и растений. В почве большая часть фосфора представлена в форме нерастворимых органических соединений – фитатов (*мио*-инозитол гексакифосфоатов), которые являются главным лимитирующим фактором роста и развития растений (Ma et al., 2012). В отличие от растений, многие микроорганизмы, бактерии и микромицеты, способны разрушать труднодоступные для высших эукариот фитаты (Ахметова с соавт. 2012, Greiner et al., 2011). Это обеспечивается их способностью синтезировать специфические ферменты – фитазы (*мио*-инозитол гексакифосфат фосфогидролазы), разрушающие фитаты почвы (Yao et al., 2011, Сулейманова с соавт., 2012). Хотя фитазы образуются в клетках некоторых растений и животных, их каталитическая активность невелика (Gontia et al., 2012).

Использование фитаз микробного происхождения в решении проблемы фосфорного питания представляет ведущее направление в современной практической микробиологии. Такие работы выполнены преимущественно с использованием генов грибных фитаз. Секвенирование большого числа бактериальных геномов показало широкое распространение генов фитаз у бактерий. Среди них почвенные бактерии рода *Pantoae* продуцируют гистидиновые кислые фитазы и секретируют их в периплазму (Greiner, 2007). Перспективы также связаны с использованием внеклеточных фитаз β-пропеллерного типа (BPP), встречающихся у представителей почвенных грамположительных бактерий рода *Bacillus*. BPP-фитазы устойчивы к высоким температурам, активны в нейтральном (физиологическом) диапазоне pH и обладают узкой субстратной специфичностью в отношении фитата, в связи с чем, бациллярные фитазы являются важным объектом для микробной биотехнологии (Fu et al., 2008b). Разработаны различные способы получения генно-модифицированных растений. Эффективным методом является агробактериальная трансформация растений, основанная на природной способности бактерий рода *Agrobacterium* встраивать собственные гены в геном растительного организма. Перспективно клонирование генов различных бактериальных фитаз в Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* с последующей трансформацией растений. Гетерологичная экспрессия бактериальных фитаз и секреция ферментов в ризосферу позволят повысить доступность фосфора для растений. Решение проблемы обеспечения культурных растений неорганическим фосфатом без использования дополнительных ресурсов в виде минеральных удобрений представляет практический интерес для сельского хозяйства.

Цель исследования – разработка гетерологичных систем на основе генов бактериальных фитаз и анализ их экспрессии в растениях *Arabidopsis thaliana*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Получить трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* с интегрированными генами микробных фитаз *Bacillus ginsengihumi* и *Pantoae agglomerans* под контролем растительного промотора Pht1;2.

2. Установить экспрессию генов бактериальных фитаз *Bacillus ginsengihumi* и *Pantoae agglomerans* в трансгенных растениях.

3. Определить активность бактериальных фитаз при выращивании растений на средах с разными источниками фосфора (с фитатом или неорганическим фосфатом в качестве единственного источника фосфора).

4. Определить влияние экспрессии микробных фитаз на количество общего неорганического фосфора в тканях растений при выращивании растений на средах с фитатом и с неорганическим фосфором.

5. Изучить влияние экспрессии микробных генов фитаз на рост и развитие растений.

Научная новизна. Получены новые знания о гетерологичной экспрессии микробных фитаз растениями, о влиянии бактериальных фитаз на способность растений расти в условиях лимитирования по источнику фосфора. Впервые получены гетерологичные системы экспрессии на основе бактериальных фитаз *B.ginsengihumi* и *P. agglomerans* с использованием растительного индуцибельного промотора с направленной тканеспецифичной экспрессией. Впервые дана комплексная оценка гетерологичной экспрессии генов микробных фитаз *B.ginsengihumi* и *P. agglomerans,* относящихся к различным группам, гистидиновым кислым и щелочным бета-пропеллерным фосфогидролазам, в растениях. Установлены экспрессия и локализация бактериальных фитаз *B.ginsengihumi* и *P. agglomerans* в корнях растений *A. thaliana*, что позволило растениям усваивать фосфор из труднодоступного органического соединения почвы – фитата. Получены приоритетные данные о влиянии модификации на характеристики растений, их рост и развитие.

Практическая значимость работы. Нами разработана новая экспрессионная система на основе генов бактериальных фитаз с использованием растительного индуцибельного промотора и растительного сигнального пептида для целевой экспрессии гетерологичных белков в ризосфере растений. Растения, синтезирующие бактериальные фитазы, эффективно растут на среде с труднодоступным фитатом в качестве основного источника фосфора без дополнительного внесения фосфатов. Практическая значимость разработанного нами метода заключается в потенциальном снижении затрат на выращивание культурных растений в лимитированных условиях за счет отказа от применения минеральных удобрений и повышении рентабельности сельскохозяйственного производства.

Положения, выносимые на защиту:

1. Созданы гетерологичные системы экспрессии на основе генов бактериальных фитаз *B.ginsengihumi* и *P. agglomerans* для агробактериальной трансформации растений.

2. Получены растения *Arabidopsis thaliana*, направленно экспрессирующие бактериальные фитазы в клеточной стенке корней.

3. Модифицированные растения способны расти на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора, экспрессия микробных фитаз способствует улучшению роста и развития растений.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных высокоточных приборах; опубликованием полученных данных в отечественных и зарубежных журналах, с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на Международных, Всероссийских и региональных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» (Иркутск, 2015), Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012, 2014), Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2013, 2012, 2014), 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2013, 2014), Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 2013), Молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2013), XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых: «Михаил Ломоносов», (Москва, МГУ, 2012, 2013), XX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и Биотехнология» (Казань, 2013), Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013), Международной конференции «Современное состояние тенденций научных исследований, искусственных и естественных нанообъектов – STRANN-2012» (Россия 2012), III Ежегодной международной научно-практической конференции бакалавров, магистров и аспирантов в биологии, посвященной академику П. Кометиани (Грузия, 2011), Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань 2011).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности «Казанского (Приволжского) федерального университета» среди ведущих мировых научно–исследовательских центров, в рамках Open Lab «Микробные биотехнологии», а также, частично, за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83 0211/02.11.10083.001). Исследования выполнены при поддержке грантов: РФФИ 12-08-00942-а, гранта для молодых ученых от Академии наук республики Татарстан № 13-24/2011, Федеральной целевой программы

«Научные и научно - педагогические кадры инновационной России» 2009-2013гг.: ГК № П344, ГК № П406, ГК № П323, ГК № 815, ГК № 1053, ГК № 14.A18.21.0575.

Личный вклад автора заключается в разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации ее экспериментального решения, интерпретации полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 29 научных работ, в том числе, 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов диссертации, 1 учебно-методическое пособие.

Структура и объём диссертации. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение и список литературы. Работа изложена на 93 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 19 рисунков. Библиография содержит 134 наименования статей российских и зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору ИФМиБ М.Р. Шариповой за постановку проблемы, обсуждение результатов и внимательное отношение к работе, в.н.с., Ph.D. in Biochemistry, Е.В. Шакирову за постоянные консультации, помощь в освоении новых методов и обсуждение полученных результатов, м.н.с. Л.Р. Валеевой за поддержку и помощь в работе. Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам кафедры и лаборатории за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и плазмиды. В работе использовали штаммы *Bacillus ginsengihumi, Pantoae agglomerans* и *E. coli DH5α* из музея кафедры микробиологии КФУ. Штамм *E. coli DH5α* использовали для получения гетерологичных систем экспрессии бактериальных генов фитаз. Бактерии *Agrobacterium tumefaciens GV3101* и плазмида pCBK05 для трансформации растений любезно предоставлены для работы Е. В. Шакировым (University of Texas at Austin, Austin USA). В качестве векторов экспрессии использовали плазмиды pCEV01, pCEV02, pCEV03, которые получили на основе вектора pCBK05 (рис. 1 А, Б, В).

Для культивирования бактерий использовали среду LB (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5 (Sambrook et al., 1989). Рост бактерий оценивали по изменению оптической плотности культуры на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при λ=590 нм. Количество биомассы выражали в единицах оптической плотности. Стерилизацию сред проводили при 1 атм в течение 30 мин. Перед стерилизацией pH среды доводили 40%-ным раствором NaOH до значения pH 8.5.

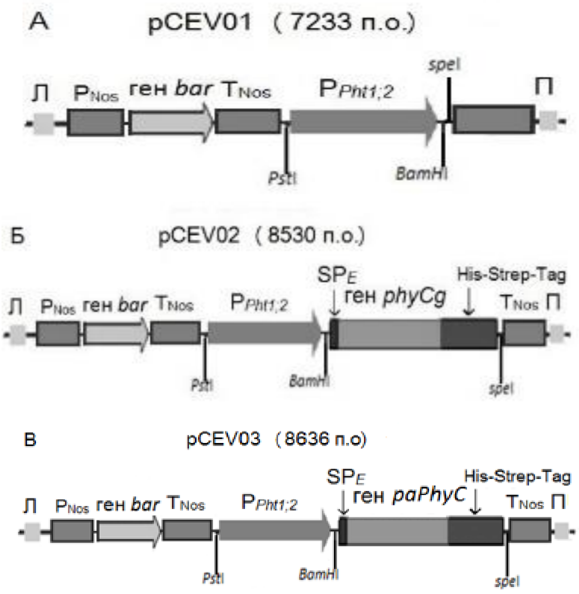


Рисунок 1 – Схема Т-ДНК в составе плазмид *A. tumefaciens* для трансформации растений арабидопсиса. **А** – вектор pCEV01 с растительным промотором Pht1;2, **Б** – вектор pCEV02 с промотором Pht1;2 и геном фитазы *B. ginsengihumi,* **В** – вектор pCEV03 с промотором Pht1;2 и геном фитазы *P. agglomerans,* $P_{pht1;2}$ – индуцибельный тканеспецифичный промотор гена фосфатного транспортера эпителиальных клеток корней *A. thaliana*; SP_E –сигнальный пептид растительного гена экстенсина; *bgPhyC* – ген фитазы *B. ginsengihumi,* paPhyC – ген фитазы *P. agglomerans*; His-Strep-Tags – 3’-концевые последовательности пептидных тагов; ген *bar* – ген устойчивости к гербициду BASTA; P_{nos} и T_{nos} - промотор и терминатор гена нопалинсинтазы (*nos*); П и Л – правая и левая фланкирующие последовательности Т-ДНК, соответственно; PstI, BamHI, SpeI – сайты рестрикции.

Трансформацию бактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 проводили методом электропорации. Трансформацию бактерий *E.coli* DH5α проводили как описано в работе (Sambrook, 1989).

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (экотип Columbia, далее WT). Семена любезно предоставлены для работы Е.В. Шакировым (Austin, USA). Растения выращивали в ростовой камере (Binder, Германия). Семена, предварительно выдержанные 2-3 дня при 4 ºC, высевали в стерильную увлажненную почву. Условия роста *A. thaliana*: фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь, 22 ºC, влажность воздуха 60%.

Для селекции растений семена высевали стерильно на чашки Петри с использованием среды MS (Мурашига-Скуге) (Murashige-Skoog, 1986) с добавлением гербицида BASTA в концентрации 25 мкг/мл. Для защиты от контаминантной микрофлоры в среду MS вносили антибиотик ванкомицин (100 мкг/ мл). Для анализа экспрессии бактериальных фитаз растения выращивали на стандартной минеральной среде с 0.7 % агаром без добавления источников фосфора (Tocquin et al., 2003).

Для анализа экспрессии бактериальных фитаз модифицированные растения выращивали на гидропонной установке в климатической камере (SANYO, Япония) (Tocquin et al., 2003). В качестве источника фосфора использовали фитат натрия ($C_6H_{18}0_{24}P_6$ × xNa × yH_2O) (Sigma) – 133 мкМ, неорганический фосфат (Na_2HPO_4) – 0.8 мМ.

Трансформацию растений *Arabidopsis thaliana* проводили методом макания цветков растений в суспензию бактерий *Agrobacterium tumefaciens* как описано в работе (Clough, Bent, 1998).

Выделение суммарной РНК растений проводили по стандартной методике с использованием буферов для разрушения растительных клеточных стенок (Cell lysis buffer, CLB) и осаждения ДНК-белковых комплексов (Protein DNA precipitation buffer. PPB), (Onate-Sanchers, Vicente-Carbajosa, 2008).

Комплементарную ДНК получали по стандартной методике с использованием набора для получения кДНК «RevertAid (H-) FirstStrand» (Fermentas). В качестве праймера использовали последовательность Oligo dT. Полученную общую кДНК растений хранили при -20 ˚C.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в термоциклере «MJ mini» производства фирмы «BioRad» с использованием Taq-полимеразы (Сибэнзим), как описано в работе (Sambrook, 1989)

Для выделения белковых фракций из корней растений использовали метод, описанный в работе (George et al., 2004). Получали фракцию растворимых внутриклеточных белков и фракцию белков, связанных с клеточной стенкой корней. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с использованием набора реагентов Protein assay Dc (Bio-Rad). Белковые растворы хранили при -80 ˚C. В белковых фракциях определяли фитазную активность. Для иммуноблотинга белковые фракции концентрировали осаждением 50% ТХУ.

Электрофорез в ПААГ проводили в денатурирующих условиях в присутствии SDS в 12.5%-ном ПААГ по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Использовали маркеры PageRuler Prestained Protein Ladder с молекулярной массой от 10 до 170 кДа (Fermentas).

Вестерн-блоттинг проводили как описано в работе (Mahmood et al., 2012). Для проявления мембраны использовали первичные антитела к His-tag последовательностям (6x-His Epitope Tag Monoclonal Antibody ThermoScientific) и вторичные антитела, которые специфичны к первичным антителам (Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Thermo Scientific).

Определение фитазной активности проводили как описано в работе (Jog et al., 2005). За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мМ субстрата за 1 мин.

Определение сухого веса тканей растений и **определение содержания тканевого фосфора** в побегах растений проводили по методам как описано в работе (Richardson et al., 2001).

Для характеристики **морфологических параметров** розетки листьев и корни растений фотографировали и проводили измерения с помощью программного обеспечения ImageJ для 10-15 индивидуальных растений каждой линии.

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2013. Для описания и сравнения признаков использовали построение 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение гетерологичной системы экспрессии. Все процессы получения гетерологичных систем экспрессии бактериальных фитаз выполнены в штамме *E.coli DH5*. Для создания гетерологичной системы экспрессии использовали нуклеотидные последовательности бактериальных генов, кодирующих фитазы, относящиеся к разным группам: β-пропеллерная фитаза *B. ginsengihumi* (bgPhyC) и гистидиновая кислая фитаза *P.agglomerans* (paPhyC). Нуклеотидные последовательности генов бактериальных фитаз оптимизировали с помощью программы Codonadaptiontool (http://www.jcat.de/) для эффективной экспрессии в клетках растений. К 5'-концам генов фитаз добавляли нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид белка экстенсина клеточной стенки моркови, для обеспечения секреции бактериального фермента из клетки. К 3'-концам генов фитаз добавляли His–Strep-tag последовательности для детекции белка в тканях растений с помощью иммуноблотинга. Модифицированные бактериальные гены фитаз ex::bgphyC::His-Strep-Tag (1297 п.о.) и ex::paPhyC::His-Strep-Tag (1403 п.о.) синтезировали для последующей трансформации в растения. Для эффективной экспрессии к конструкции добавляли индуцибельный тканеспецифичный промотор гена фосфатного транспортера эпителиальных клеток корней *A. thaliana* (Pht1;2, 1933 п.о.), который амплифицировали на матрице геномной ДНК *A.thaliana*, используя специфические праймеры. Промоторную последовательность Pht1;2 (1933 п.о.) клонировали в область Т-ДНК вектора pCBK05 (6100 п.о.). Полученный вектор pCEV01 использовали в качестве контрольного (без генов фитаз) для трансформации растений. Модифицированные бактериальные гены ex::bgphyC::His-Strep-Tag (1297 п.о.) и ex::paPhyC::His-Strep-Tag (1403 п.о.) клонировали под контролем промотора Pht1;2 в область Т-ДНК вектора pCEV01. В результате получили новые бинарные векторы pCEV02 и pCEV03, несущие модифицированные гены фитаз *B. ginsengihumi* и *P.agglomerans*, соответственно. Присутствие вставок в векторах тестировали с помощью рестрикционного анализа с применением рестриктаз *Pst*I и *Spe*I (рис. 2). Полученные конструкции Pht1;2::ex::bgPhyC::His-Strep-Tag и Pht1;2::ex::paPhyC::His-Strep-Tag включали 3230 и 3336 пар оснований, соответственно (рис. 2).

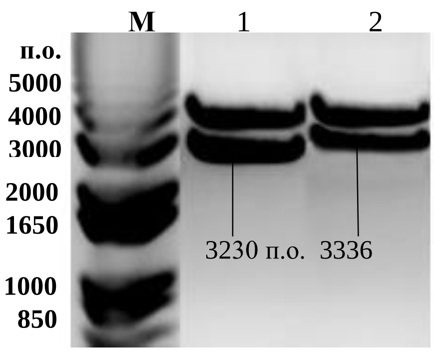


Рисунок 2 – Электрофорез ДНК-рестриктов плазмид pCEV02 и pCEV03 в 1% агарозном геле. 1- рестрикты вектора pCEV02, содержащего вставку Pht1;2::ext::bgPhyC::His-Strep-Tag (3230 п.о.), 2 – рестрикты вектора pCEV03, содержащего вставку Pht1;2::ext::paPhyC::His-Strep-Tag (3336 п.о.) (Рестрикты получены с помощью рестриктаз Pst1 и SpeI), **М** – маркеры)

Бинарные вектора pCEV01, pCEV02, pCEV03 транформировали в растения, используя метод агробактериальной трансформации.

1.2. Селекция трансгенных растений. Получали семена растений, трансформированных агробактериями. Семена высевали на чашки Петри с селективной средой MS с добавлением гербицида BASTA и антибиотика ванкомицина. Селекцию растений проводили по способности расти на среде с гербицидом. Через 5-6 сут наблюдали прорастание семян и образование у трансформантов первичных листьев. Растения дикого типа были чувствительны и погибали. Трансгенные растения выявляли визуально: они имели хорошо развитый корень, ярко-зеленые листья. Растения дикого типа погибали на стадии прорастания корешка, или при образовании первичных листьев (рис. 3).

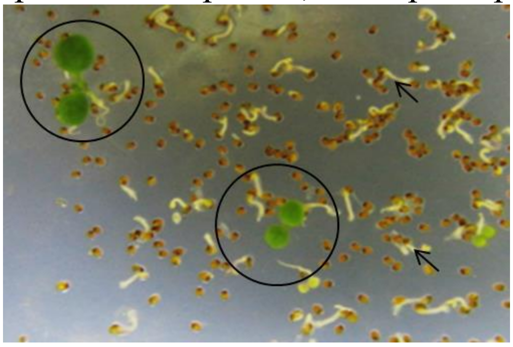


Рисунок 3 – Селекция трансгенных растений на среде MS с добавлением гербицида BASTA. Окружностями отмечены трансгенные растения, стрелками – растения дикого типа.

Трансгенные растения выращивали в отдельных горшочках. Из семян растений, трансформированных вектором с геном фитазы *B. ginsengihumi*, получили 28 растений (К1 линия) первого поколения (Т1). В 13 растениях (13 индивидуальных линий) наличие гена бактериальной фитазы подтвердили методом ПЦР (рис. 4А).

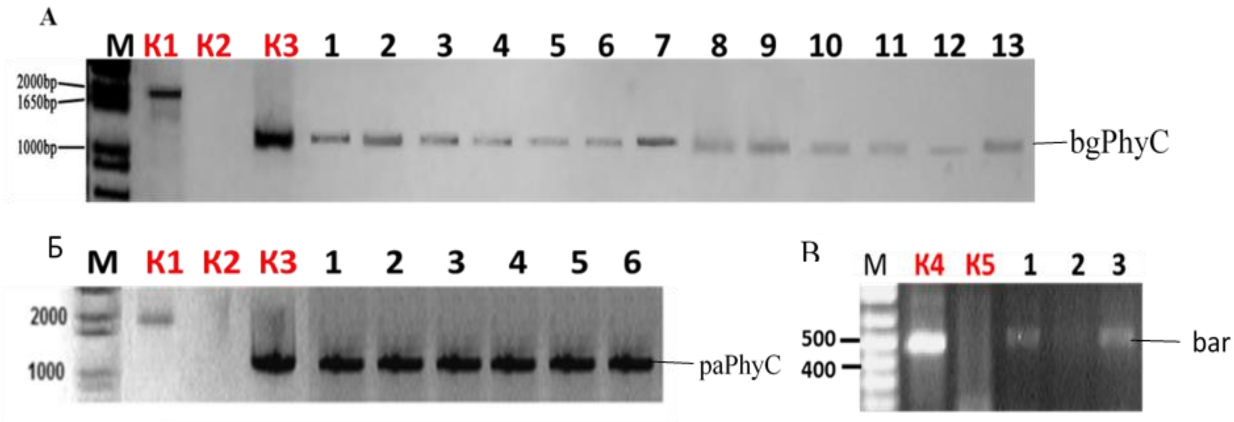


Рисунок 4 – Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных растений Т1 поколения: **А** – Линия К1 с геном фитазы *B.ginsengihumi*, **1-13** – амплифицированная ДНК для 13-ти трансгенных растений (ождаемые размеры - около 1300 п.о); **Б** – Линия G2 с геном фитазы *P. agglomerans*. **1-6** – амплифицированная ДНК для трансгенных растений (ожидаемые размеры - около 1400 п.о**.**); **В -** Линия А1 без гена фитазы (нулевой контроль), **1-3** – амплифицированная ДНК трансгенных растений (ожидаемые размеры - около 500 п.о.); **М** – маркеры; **К1** – амплифицированная ДНК WT, полученная с праймерами к промотору Pht1;2 (положительный контроль); **К2** – амплифицированная ДНК WT, полученная с праймерами к гену фитазы (отрицательный контроль); **К3** – амплифицированная ДНК плазмиды pCEV01, полученная с праймерами к гену фитазы (положительный контроль).

Каждое из 13 трансгенных растений первого поколения положило начало индивидуальным трансгенным линиям (например, К11, К17, К119). Растения выращивали на почве, от каждой линии получили семена и провели селекцию растений второго поколения (Т2) на среде с гербицидом. Для шести линий трансгенных растений Т2 сегрегация признака (устойчивость к гербициду, наличие трансгенной вставки) составила 3:1 (выжившие:умершие), что соответствовало единичной вставке Т-ДНК в геноме этих растений. Далее от 12 растений Т2 каждой линии получили семена и провели отбор гомозиготных по трансгенной вставке растений третьего поколения (Т3). В дальнейшем из них отобрали 4 линии трансгенных растений, гомозиготных по интегрированному гену фитазы *B. ginsengihumi* (линии растений К1115, К1725, К1726, К1151).

Из семян растений, трансформированных вектором с фитазой *P. agglomerans,* получили 36 трансгенных растений (G2 линия), для 6 из которых наличие гена фитазы подтвердили методом ПЦР (рис. 4Б). У 5 из 12 линий растений Т2, несущих ген фитазы *P. agglomerans,* расщепление по селективному признаку составило 3:1 (единичная вставка). В поколении Т3 получили 5 линий растений, гомозиготных по гену микробной фитазы (линии G214, G251, G256, G2113, G2191).

Методом ПЦР установили наличие вставки в 3 контрольных трансгенных растениях, несущих промотор Pht1;2 без структурного гена бактериальной фитазы (А1 линии) (рис. 4В). Во втором поколении получили 3 линии растений с расщеплением 3:1, в третьем поколении получили 3 линии растений, гомозиготных по трансгенной вставке.

Таким образом, получили трансгенные растения гомозиготные по бактериальной Т-ДНК с интегрированными генами микробных фитаз *B.ginsengihumi* и *P. agglomerans.*

3. Экспрессия бактериальных генов фитаз на уровне транскрипции. Из корней трансгенных растений гомозиготных линий, выращенных в течение 14 дней на минеральной среде без добавления фосфора, выделяли суммарную РНК. После получения кДНК проводили ПЦР. Для амплификации использовали праймеры к модифицированным генам фитаз, содержащих фрагмент растительной ДНК с промотором Pht1;2. Этот участок содержал интрон (256 п.о.), что обуславливало разный размер продуктов амплификации с геномной ДНК и с кДНК трансгенных растений.

Продукты амплификации геномной ДНК и кДНК анализировали электрофорезом в агарозном геле. Размер амплификата с геномной ДНК G2 линии показал 885 п.о. (рис. 5А линия 1). А размер амплификата с кДНК двух линий трансгенных растений G214, G2191, несущих ген фитазы *P. agglomerans* (paPhyC) - около 650 п.о., что указывало на удаление интрона во время сплайсинга (рис. 5А линии 4, 5).

Размер амплификата с геномной ДНК растений линий К1 составил 850 п.о. (рис. 5Б линия 1). Размер амплификата с кДНК трансгенных растений линий К1725 и К1151 с интегрированным геном фитазы *B.ginsengihumi* (bgPhyC) составил 600 п.о., что соответствовало ожидаемому (рис. 5Б, линии 2 и 3). Результаты ПЦР контрольных проб с геномной ДНК линий К1 и G2 (850 и 885 п.о.) показали, что в кДНК не было загрязнений геномной ДНК трансгенных растений.

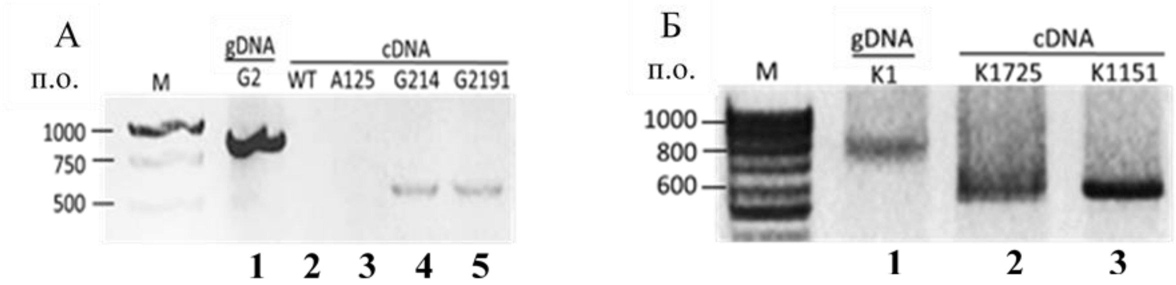


Рисунок 5 – Электрофорез продуктов амплификации кДНК трансгенных растений. А – для растений с интегрированным геном фитазы *P. agglomerans*, Б – для растений с интегрированным геном фитазы *B. ginsengihumi*; М – маркеры; gDNA - геномная ДНК, cDNA–комплементарная ДНК.

В качестве отрицательного контроля проводили ПЦР кДНК, выделенной из растений дикого типа (WT) и линий А125 (трансгенные растения без гена фитаз) с использованием праймеров к фрагменту, содержащему последовательность промотора Pht1;2 (рис. 5А линии 2, 3). Результаты показали отсутствие бактериального кДНК в отрицательном контроле. Синтез стабильной РНК для генов бактериальных фитаз в тканях растений подтвердили секвенированием продуктов амплификации с кДНК транскриптов.

Таким образом, нами установлена экспрессия генов бактериальных фитаз в клетках корней растений на уровне транскрипции.

4. Иммуноблотинг продуктов экспрессии генов микробных фитаз в клетках корней растений. Для проведения иммуноблотинга белковых экстрактов растений трансгенные растения с геном bgPhyC (линии К1725, К1151), с геном paPhyC (линия G214), растения дикого типа и растения с Т-ДНК без гена фитазы (нулевой контроль - А125) предварительно выращивали на гидропонной системе со стандартной средой. В качестве источника фосфора использовали фитат и неорганический фосфор. Для индукции промотора Pht1;2 в клетках эпидермиса корней трансгенные растения выращивали в течение 28 дней. Затем из корней выделяли две белковые фракции: фракцию растворимых внутриклеточных белков и фракцию белков, связанных с клеточной стенкой корней. Для анализа использовали антитела, специфичные к последовательностям His-Tag на С-концах рекомбинантных фитаз.

Вестерн-блот-анализ во фракции внутриклеточных растворимых белков трансгенных растений линий К1725, К1151 и G214 не выявил наличие бактериальных фитаз *B.ginsegihumi* и *P.agglomerans*. Однако во фракции белков, связанных с клеточной стенкой корней трансгенных растений (линии К1725, К1151 и G214), выращенных на среде с фитатом, показал наличие обеих фитаз: *B.ginsegihumi* и *P.agglomerans* (рис. 6, линии 3,4 и 5).

Вестерн-блот с белками из корней трансгенных растений линии А125 (нулевой контроль), а также из корней растений дикого типа (отрицательный контроль) показал отсутствие бактериальных белков (рис. 6, линии 1, 2). Молекулярная масса фитазы *B. ginsengihumi* и фитазы *P. agglomrens* составила около 37 кДа и 42 кДа, соответственно.

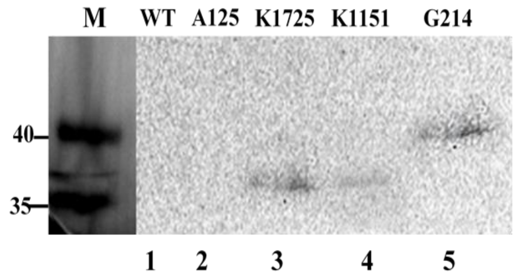


Рисунок 6 – Иммуноблотинг фитаз фракции белков, связанных с клеточной стенкой корней трансгенных растений, выращенных на среде с фитатом. **M** – Маркеры молекулярного веса, **WT** – Растения дикого типа, **A125** – Нулевой контроль. **K1725, K1151** – растения с геном фитазы *B. ginsengihumi*, **G214** – растения с геном фитазы *P. agglomrens*.

Вестерн-блот фракции белков, связанных с клеточной стенкой корней трансгенных растений, выращенных на среде с добавлением неорганического фосфора, показал отсутствие полос, соответствующих бактериальным фитазам. Эти данные указывают, что на среде с неорганическим фосфором растительный индуцибельный промотор Pht1;2 не активен.

Таким образом, нами установлено наличие бактериальных фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomrens* в клеточных стенках корней модифицированных растений в индуцируемых условиях на среде с фитатом.

5. Фитазная активность в корнях трансгенных растений *A. thaliana*. Определяли фитазную активность в двух белковых фракциях корней трансгенных растений (рис.7А, Б).

У растений дикого типа (отрицательный контроль) и растений линии А125 без гена фитазы (нулевой контроль) на средах с обоими источниками фосфора фитазная активность во фракции внутриклеточных растворимых белков составила 0.5-2.01 и 0.5-2.6 Ед/мг белка (рис. 7А). У трансгенных растений с геном *B. ginsengihumi* (К1725) и с геном *P. agglomerans* (G214) на среде с неорганическим фосфором активность фитазы составляла около 4 Ед/мг. На среде с фитатом активность фитазы у трансгенных растений линии G214 не отличалась от дикого типа, тогда как у трансгенных растений линии К1725 составила до 5 Ед/мг белка (рис. 7А).

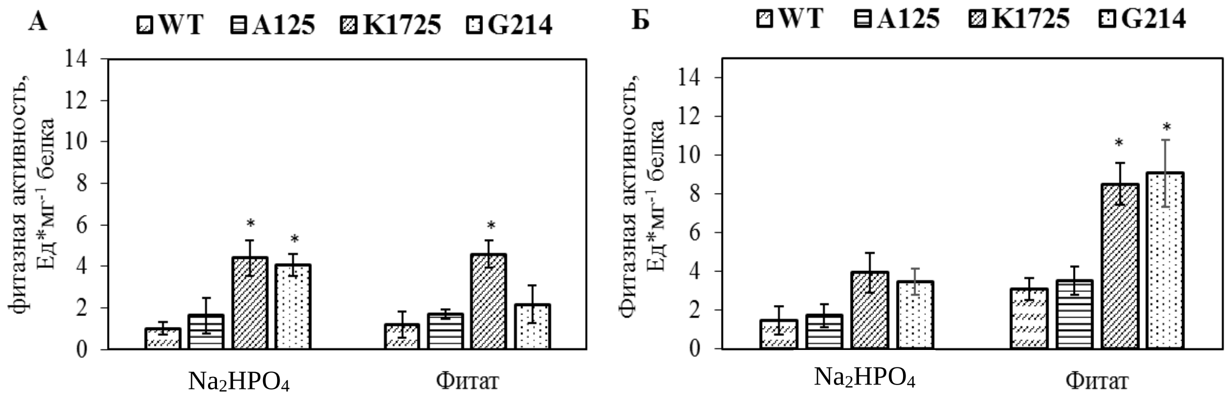


Рисунок 7 – Фитазная активность в корнях трансгенных растений. **А** – фракция внутриклеточных растворимых белков корней, **Б** - фракция белков, связанных с клеточной стенкой корней, (*P<0.05), WT – Растения дикого типа, А125 – Нулевой контроль**,** K1725 – трансгенные растений с геном фитазы *B. ginsengihumi*, G214 – трансгенные растений с геном фитазы *P. agglomerans*. (*P<0.05).

Определяли фитазную активность во фракции белков, связанных с клеточной стенкой корней. На среде с неорганическим фосфором статистически значимых различий в фитазной активности растений линий K1725 и G214 по сравнению с диким типом и нулевым контролем A125 не обнаружили (рис. 7Б). Фитазная активность составила 3.9±1.02 Ед/мг, и 3.4±0.6 Ед/мг, соответственно для K1725 и G214 линий, 1.4±0.7 Ед/мг и 1.5±0.02 Ед/мг для растений дикого типа и линии A125 (рис. 7Б). Однако на среде с фитатом фитазная активность трансгенных растений в 2.5-3 раза выше ($P<0.05$) по сравнению с растениями дикого типа и линии A125(нулевой контроль). Фитазная активность у растений линий K1725 и G214 составила 8.5±1.06 и 9.04±1.7 Ед/мг белка, соответственно (рис. 7Б). Отметим незначительное различие в фитазной активности между линиями трансгенных растений: у растений линии G214 (paPhyC) активность фитазы на 6.3% выше по сравнению с растениями линии K1725 (bgPhyC).

Таким образом, обнаруженная нами высокая фитазная активность во фракции белков, связанных с клеточной стенкой корней трансгенных растений, на среде с фитатом свидетельствует об индукции тканеспецифичной экспрессии рекомбинантных микробных фитаз в условиях фосфорного голодания. Обе фитазы активны в клеточных стенках трансгенных растений.

6. Влияние микробных фитаз на морфологию трансгенных растений. Для изучения влияния экспрессии микробных фитаз на морфологию трансгенных растений на среде с различными источниками фосфора использовали гидропонную систему, что позволило нам контролировать состав среды и исключило отрицательное влияние таких факторов, как гипоксия и другие стрессы, возможные в закрытых стерильных колбах. Также на гидропонной среде возможно получение большого количества тканевого материала без потери в процессе его отбора. Для анализа растений гомозиготные трансгенные линии растений с генами фитаз *B. ginsengihumi* (K1725) и *P. agglomerans* (G214), нулевого контроля (A125) и растения дикого типа выращивали на гидропонной системе со стандартной средой с добавлением Na_2HPO_4 или фитата в качестве единственного источника фосфора. Растения выращивали в течение 25-28 дней. Затем проводили анализ морфологии побегов и корневой системы, а также определяли сухой вес растений и содержание неорганического фосфора в тканях растений.

6.1. Влияние микробных фитаз на морфологию листьев. Анализ влияния микробных фитаз на морфологию листьев трансгенных растений проводили на основе следующих параметров: диаметр и площадь розеток, сухой вес розеток и содержание фосфора в них. Измеряли общую площадь листьев розетки, диаметр розетки. Далее растения высушивали и измеряли сухой вес.

Диаметр и площадь листовой розетки. По диаметру и площади листовой розетки на среде с добавлением неорганического фосфора трансгенные растения и растения дикого типа не имели видимых различий. Измерения параметров показали статистически незначимые различия ($P>0.05$) между растениями дикого типа и трансгенными линиями (рис. 8А, Б). Диаметр розетки в среднем для всех растений составил 3.2 – 4.5 см/растение, общая площадь листовой розетки дикого типа, нулевого контроля А125, трансгенных растений К1725 и G214 составила 6.06, 3.5, 4.9, и 6.6 см^2/растение, соответственно (статистических различий нет, P>0.05) (рис. 9А, Б).

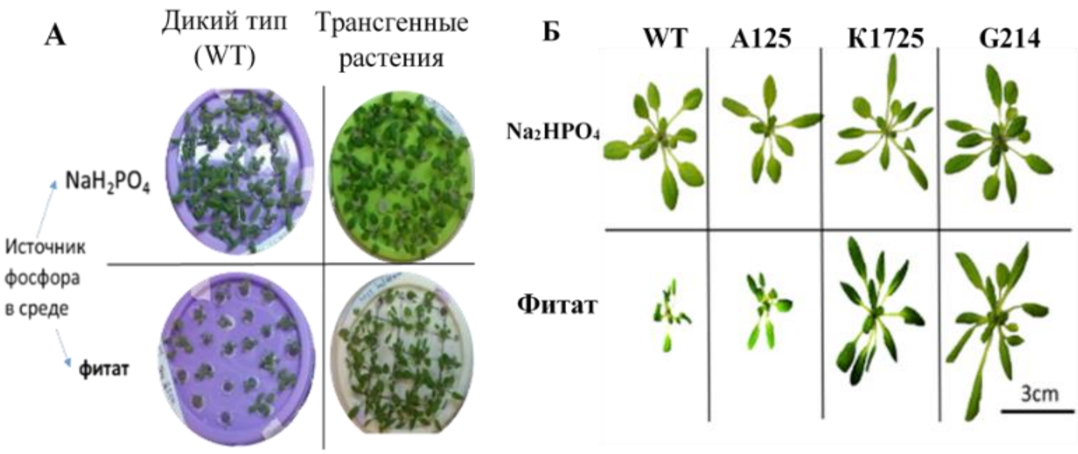
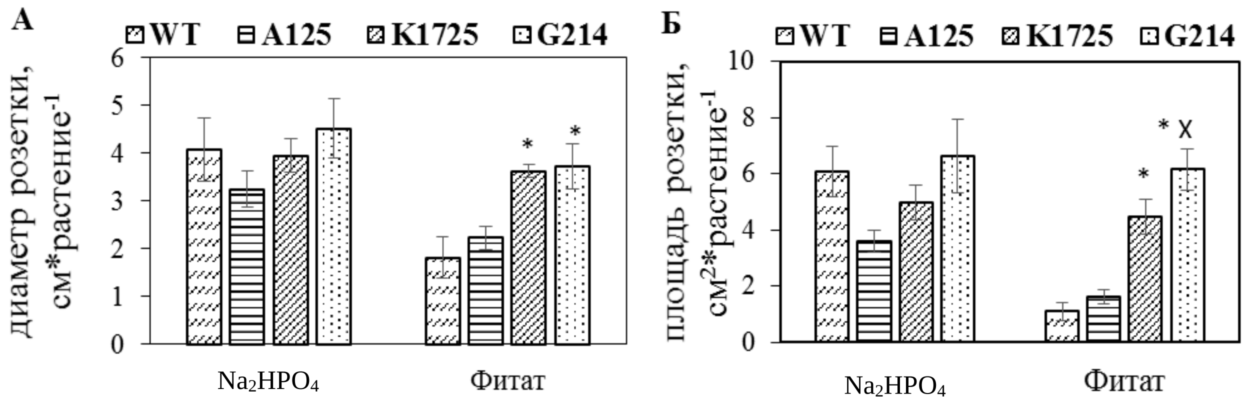


Рисунок 8 – Рост трансгенных растений и растений дикого типа на гидропонной системе с неорганическим фосфором (Na_2HPO_4) и фитатом. **А** – рост растений. **Б** –розетки растений: WT – Растения дикого типа, A125 – Нулевой контроль**,** bgPhyC– трансгенные растения с геном фитазы *B. ginsengihumi*, paPhC– трансгенные растения с геном фитазы *P. agglomerans*.

На среде с фитатом диаметр розетки у растений дикого типа (WT) и линии А125 (нулевой контроль) был в 2.2 и 1.4 раза меньше, чем у этих растений, выращенных в присутствии неорганического фосфора. Трансгенные растения на среде с фитатом росли значительно лучше по сравнению с растениями дикого типа и линии А125 (рис. 8А, Б). Статистически значимых различий между измеряемыми параметрами для трансгенных линий, выращенных на среде с фитатом или с фосфатом мы не обнаружили (3.6 и 3.7 см/растений на среде с фитатом 3.9 и 4.5 на среде с неорганическим фосфатом для линий К1725 и G214) (рис. 9А). Причем при росте на среде с фитатом диаметр розетки трансгенных растений К1725 с бациллярной фитазой bgPhyC был в 2 раза больше по сравнению с растениями дикого типа (P<0.05). Диаметр розетки растений трансгенной линии G214 с фитазой paPhyC также в 2 раза больше по сравнению с растениями дикого типа (P<0.05) (рис. 9А). Площадь листовых розеток у растений дикого типа и линии А125 при росте на среде с фитатом уменьшалась, как и при сравнении с растениями трансгенных линий (рис. 9Б). При росте на среде с фитатом площадь розетки у растений дикого типа и контрольных растений составляла 1.08 и 1.5 см^2/растение, тогда как площадь розетки трансгенных растений К1725 и G214 4.7 и 6.6 см^2/растение, что в 4.3 и 5.7 раза больше по сравнению с растениями дикого типа, соответственно (рис. 9Б). Диаметры розеток растений К1725 (с геном bgPhyC) и G214 (с геном paPhyC) друг от друга статистически не отличались и, в среднем, составляли 3.6 и 3.7 см/растений. Однако площадь розеток трансгенных растений G214 (с геном paPhyC) значительно больше (30%) по сравнению с растениями К1725 (с геном bgPhyC) (P<0.05).



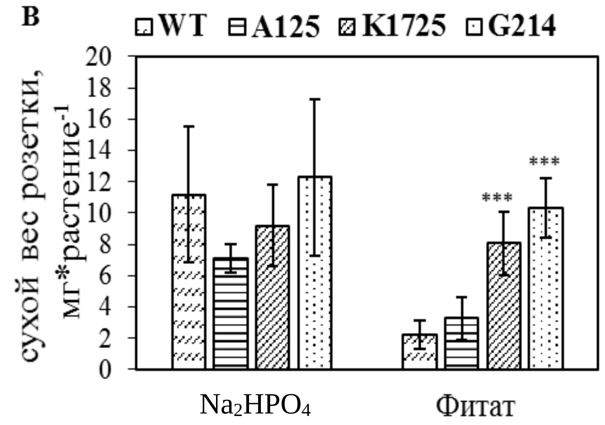


Рисунок 9 – Влияние бактериальных фитаз на развитие розеток *A. thaliana*. А – диаметр розетки, Б – общая площадь розетки, В – сухой вес розеток, WT – Растения дикого типа, А125 – Нулевой контроль, К1725– трансгенные растения с геном фитазы *B. ginsengihumi* (bgPhyC), G214 – трансгенные растения с геном фитазы *P. agglomerans* (paPhyC). (*P<0.05; ***P<0.0001(сравнение линии трасгенных растений К1725 и G214 с диким типом и нулевым контролем), ^{x}P<0,05 (сравнение между линиями К1725 и G214)).

Сухой вес розетки растений. Такая же закономерность, как и в случае с измерением линейных параметров, наблюдалась при определении сухого веса исследуемых растений. Сухой вес розетки растений дикого типа, контроля, трансгенных растений с геном bgPhyC (К1725) и с геном paPhyC(G214) при росте на среде с неорганическим фосфором варьировал в диапазоне 5.12-12.29 мг/растение (11.8, 5.12, 9.21 и 12.29 мг/растений), но статистически значимых различий мы не выявили (P>0.05) (рис 9В). Однако на среде с фитатом сухой вес растений дикого типа и линии А125 (нулевой контроль) составил 2.5 и 3.2 мг/растение, тогда как у трансгенных растений с геном bgPhyC, и с геном paPhyC 8.07 и 10.3 мг/растение, соответственно, что в 3.6 и 4.6 раза больше (P<0.0001) по сравнению с растениями дикого типа (рис. 9В). Отметим, что среднее значение сухого веса для линии G214 с геном paPhyC на 18% выше по сравнению со средним значением сухого веса для растений линии К1725 (bgPhyC).

Таким образом, гетерологичная экспрессия генов микробных фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomerans* в корнях модельных растений *A. thaliana* позволила выращивать растения на среде с фитатом в качестве основного источника фосфора, причем гетерологичные вставки не оказывали отрицательного влияния на рост и развитие растений.

6.2. Влияние экспрессии микробных фитаз на содержание фосфора в листьях растений. После измерения сухого веса мы определяли общее содержание неорганического фосфора в тканях побегов растений (рис. 10 А, Б).

Ранее показано, что у растений дикого типа *A.thaliana* при росте на среде с фитатом в качестве источника фосфора, содержание неорганического фосфора в тканях значительно снижалось в отличие от растений, выращенных на среде с неорганическом фосфатом, что указывало на неспособность этих растений усваивать фосфор из фитата (Richardson et al, 2001). Мы показали, что при росте на среде с неорганическим фосфором общее содержание неорганического фосфора в тканях побегов растений дикого типа и траснгенных растений значительно не различалось (P>0.05) и составляло в среднем 168±38 – 201±45 мкг/растений (рис. 10А). Однако на среде с фитатом общее количество неорганического фосфора у дикого типа и контрольных растений резко снижалось и составляло всего 50±14 и 42±17 мкг/растение, что сравнимо с работы (Richardson et al., 2001). Однако общее содержание фосфора в тканях трансгенных линий K1725 (с геном bgPhyC) и G214 (paPhyC) составляло 104±28; и 148±30 мг/ растений, соответственно, что в 2.08, и 2.96 раза выше (P<0.05) по сравнению с растениями дикого типа (рис. 10 А). Также у растений линии G214 (paPhyC) содержание фосфора на 30% больше, чем у растений линии K1725 (bgPhyC).

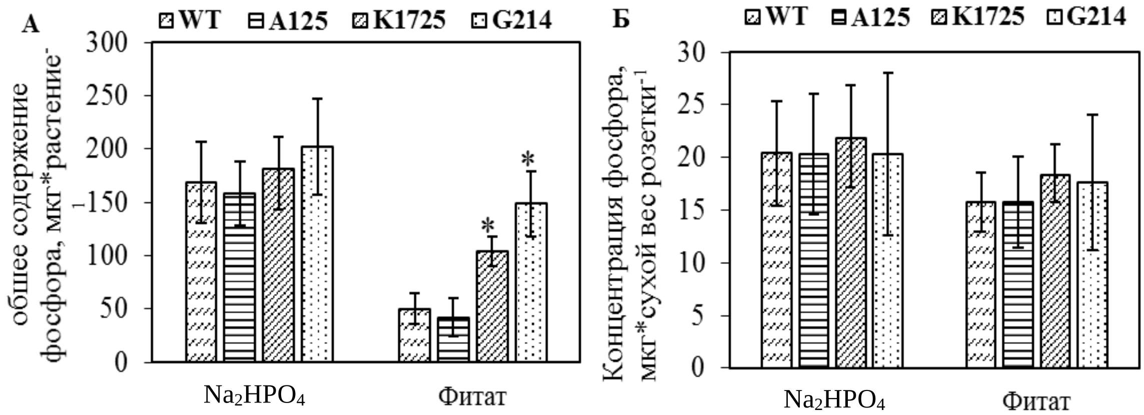


Рисунок 10 – Содержание фосфора в растениях. **А** – Общее содержание фосфора в листьях растений, **Б** – концентрация фосфора в листьях растений. Измерения проводили для 15-20 индивидуальных растений каждой линий, WT – Растения дикого типа, A125 – Нулевой контроль, K1725 – трансгенные растения с геном фитазы *B. ginsengihumi* (bgPhyC), G214 – трансгенные растения с геном фитазы *P. agglomerans* (paPhyC). (*P<0,05).

На обоих источниках фосфора среднее значение концентрации фосфора в листьях растений дикого типа и трансгенных растений, не имело значительных отличий. У растений дикого типа и трансгенных растений концентрация фосфора на среде с неорганическим фосфором и фитатом составляла в пределах 20.3±7.6 – 21.8±5 и 13.17±2 – 18.36±3.5 мкг/мг сухой массы, соответственно (рис. 10Б). Такое снижение концентрации фосфора в тканях связано с поддержанием гомеостаза фосфора клетках растений. Поскольку фосфор является одним из главных метаболитов, то наличие его минимальных концентраций в цитозоле является критическим для нормального функционирования растительного метаболизма (Lauer et al., 1989).

Таким образом, экспрессия рекомбинантных фитаз bgPhyC и paPhyC в корнях растений способствовала увеличению содержания неорганического фосфора в тканях побегов. Трансгенные вставки в обоих типах трансгенных растений не повлияли на гомеостаз фосфора в растениях.

6.3. Анализ влияния экспрессии микробных фитаз на морфологию корней. Влияние экспрессии микробных фитаз на развитие корневых систем охарактеризовали по следующим параметрам: типы корней, их внешнее описание, длина главного и боковых корней и сухой вес корней.

Показано, что условия недостатка фосфора приводили к изменению в архитектуре корней и смене развития типов корней у растений (Hodge 2004, 2009). Мы исследовали корневую систему растений дикого типа и трансгенных линий, выращенных на средах с фитатом или неорганическим фосфатом.

На среде с неорганическим фосфором морфология корней трансгенных растений не отличалась от морфологии корней растений дикого типа и характеризовалась хорошо выраженным главным корнем с ответвляющимися от него боковыми корнями (рис. 11 (Na_2HPO_4)). На среде с фитатом растения дикого типа и линии А125 имели слабо развитую корневую систему, тогда как у трансгенных растений линии К1725 (с геном bgPhyC) и линии G214 (с геном paPhyC) наблюдали развитые боковые корни, причем их длина почти не отличалась от длины главного корня (рис. 11 (фитат)). На рис. 11 длина главного корня растений и общая длина боковых корней, выращенных на среде с неорганическим фосфатом, составила в среднем 16.3-18.2 и 73.75-91.60 см/растений для дикого типа и для трансгенных линий, соответственно (рис. 12А). При росте на среде с фитатом длина главных корней растений трансгенных линий К1725 и G214 в 1.5 – 2 раза выше ($P<0.05$), чем у растений дикого типа и линии А125, общая длина боковых корней в 5 – 10 раз выше ($P<0.05$) по сравнению с растениями дикого типа и линии А125 (рис.12А, Б). Кроме того, общая длина боковых корней у линии К1725 и линии G214 при росте на среде с фитатом в 2-3 раза превышала ($P<0.05$) общую длину боковых корней растений этих линий, выращенных на среде с неорганическим фосфатом (рис. 12Б). Не выявили значительных отличий в длине главных корней и общей длине боковых корней между трансгенными растениями линии К1725 с геном bgPhyC и линии G214 с геном paPhyC на среде с фитатом. Длина главных корней у трансгенных растений линий К1725 и G214 в среднем составляла 18.07±1.8 и 21.7±1.2 см/растение, соответственно, общая длина боковых корней в среднем составляла 196±33 и 186±16 см/растение, соответственно (рис.12А, Б).

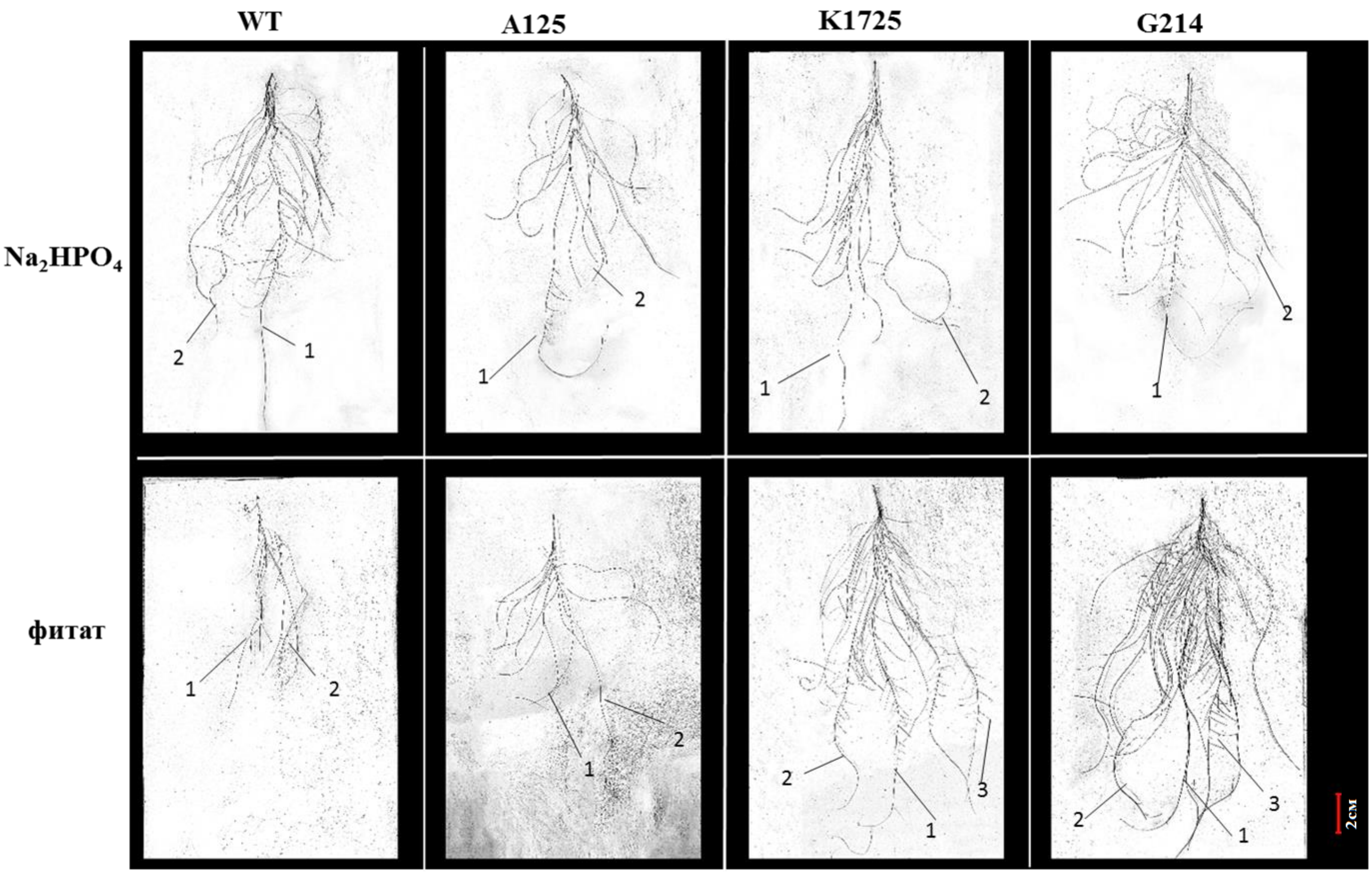
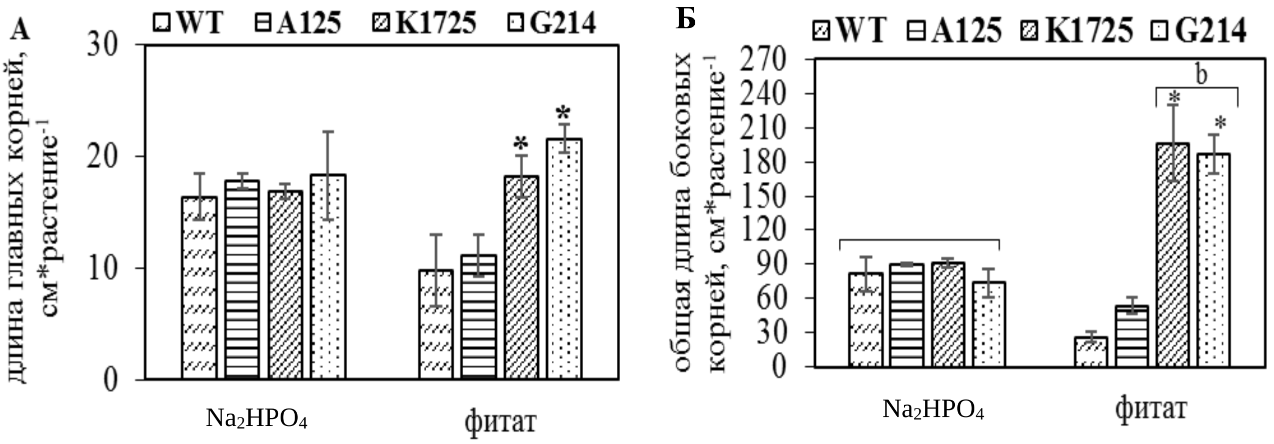


Рисунок 11 – Корневая система дикого типа и трансгенных растений на среде с неорганическим фосфатом или фитатом. 1 – главный корень, 2 – боковые корни, 3 – вторичные боковые корни (описание в тексте)



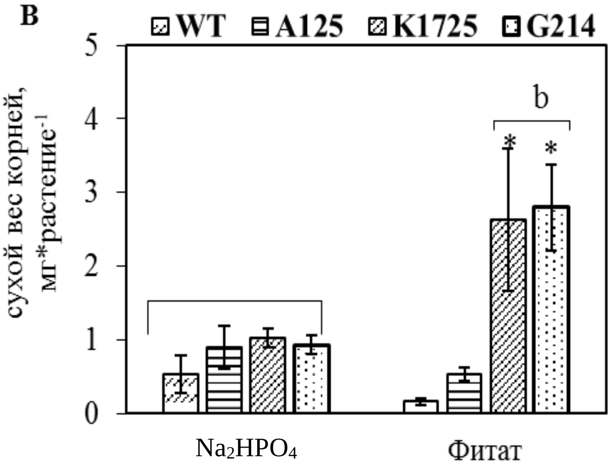


Рисунок 12 – Влияние бактериальных фитаз на образование корневой системы трансгенных растений. А – длина главного корня, Б – общая длина боковых корней, В – сухой вес корней. (*P<0.05). WT – Растения дикого типа, А125 – Нулевой контроль, К1725 – трансгенные растения с геном фитазы *B. ginsengihumi* **(**bgPhyC), G214 – трансгенные растения с геном фитазы *P. agglomerans* (paPhyC). *****P<0.05 (между растениями дикого типа и трансгенными растениями на среде с фитатом), **^{b}**P<0.05 (сравнение между растениями на среде с неорганическим фосфатом и фитатом).

Сухой вес корней трансгенных растений К1725 и G214 на среде с фитатом превышал эти значения для растений линии А125 и растений дикого типа. Сухой вес корней трансгенных растений, выращенных в присутствие фитата, был в 5-5.5 раз больше (P<0.05) по сравнению с растениями дикого типа и растениями линии А125. Кроме того, при выращивании на среде с фитатом сухой вес корней растений линий К1725 и G214 был в 2-2.5 раза больше (P<0.05) по сравнению с сухим весом корней растений, выращенных на среде с неорганическим фосфатом (рис. 12В). Это соответствовало данным литературы, что в условиях недостатка неорганического фосфата растения образуют большее количество корней (Hodge 2004, 2009). На среде с фитатом мы не выявили различия в сухом весе корней между трансгенными растениями линий К1725 и G214, в среднем он составлял 3.9±1.2 и 3.4±0.6 мг/растение, соответственно.

Таким образом, на среде с фитатом экспрессия микробных фитаз в клеточных стенках корней растений способствовала увеличению корневой массы у трансгенных растений по сравнению с диким типом и контрольными растениями, причем обе бактериальные фитазы одинаково благоприятно влияли на образование корневой системы в трансгенных растениях в условиях недостатка фосфора в среде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным подходом для решения проблемы фосфорного дефицита при выращивании культурных растений является получение растений, экспрессирующих микробные фитазы в ризосферу. Мы впервые получили гетерологичные системы экспрессии на основе генов бактериальных фитаз разных классов, растительного тканеспецифичного индуцибельного промотора и сигнального пептида для секреции микробных белков в ризосферу. С помощью агробактериальной трансформации и последующей селекции нами получены трансгенные растения *A. thaliana*, гомозиготные по бактериальной Т-ДНК с генами фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomerans*. Установлена эффективная экспрессия обоих генов бактериальных фитаз эпителиальными клетками корней растений в условиях фосфорного голодания и определена фитазная активность в корнях полученных нами трансгенных растений. Мы провели сравнительное исследование по влиянию экспрессии генов микробных фитаз на рост растений на средах с различными источниками фосфора (с неорганическим фосфором или фитатом). Установили, что экспрессия микробных фитаз в корнях трангенных растений *A. thaliana* позволила растениям усваивать фосфор из труднодоступного органического соединения - фитата и способствовала лучшему росту модифицированных растений на среде с фитатом по сравнению с растениями дикого типа. Полученные нами данные о положительном влиянии экспрессии микробных фитаз на рост растений перспективны для практического использования и выращивания растений на обедненных почвах с фитатом в качестве единственного источника фосфора без дополнительного внесения в почву минеральных удобрений. Кроме того, результаты нашей работы вносят фундаментальный вклад в область микробной биотехнологии, раскрывая потенциал экспрессии генов микробных фитаз в тканях растений с оценкой их влияния на рост и развитие растений. Разработанная нами микробная методология в перспективе будет способствовать снижению затрат на выращивание сельскохозяйственных культур в лимитированных условиях за счет отказа от применения минеральных удобрений. Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие заключения:

1. Впервые получены 3 линии трансгенных растений *A. thaliana*, гомозиготных по интегрированному гену фитазы *B. ginsengihumi* и 3 линии трансгенных растений *A. thaliana*, гомозиготных по интегрированному гену фитазы *P. agglomerans*.
2. Трансгенные растения экспрессировали гены бактериальных фитаз на уровне транскрипции и трансляции. Бактериальные фитазы секретировались в ризосферу клетками клеточной стенки корней модифицированных растений.
3. Активность обоих ферментов в клеточных стенках корней увеличилась: трансгенные растения на среде с фитатом обладали фитазной активностью в 2.5 -3 раза выше по сравнению с диким типом.
4. Установлено, что сухой вес трансгенных растений при росте на среде с фитатом увеличился в среднем в 2-3 раза, а общее содержание в них фосфора – в 3-4 раза по сравнению с растениями дикого типа.

5. Установлено, что при выращивании генно-модифицированных растений на среде с фитатом диаметр и площадь розетки увеличились в 2-3 и 4-5 раз, соответственно. Установлены изменения в структуре корней трансгенных растений: длина главных корней увеличилась в 2-3 раза, а общая длина боковых корней увеличилась в 10 раз по сравнению с растениями дикого типа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Nyamsuren Ch**., Valeeva L.R., Sharipova M. R., Shakirov E.V. An improved gene expression system to generate transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring a *Bacillus ginsengihumi* phytase gene // «Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2015. – V.6. - № 4. – P.18 – 23. ISSN: 0975-8585. (перечень ВАК), автора: 0.09 пл.
2. **Нямсурэн, Ч.,** Валеева Л. Р., Нигматуллина Л. Р., Частухина И. Б., Михайлова Е. О., Шарипова М. Р., Шакиров Е. В. Оптимизация метода определения фитазной активности в клеточных компартментах корней растения *Arabidopsis thaliana* // Вестник технологического университета. – 2015. – Т.18. - №13. – Р. 226 – 229. (перечень ВАК), автора: 0.05 пл.
3. Valeeva L.R., **Nyamsuren Ch.,** Troshagina D.S., Sharipova M. R., Shakirov E.V. Expression of *Pantoea agglomerans* phytase from a strong constitutive promoter in *Arabidopsis thaliana* plants // «Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS. - 2015. – V.6. – №4. – P. 99 – 104. ISSN: 0975-8585. (перечень ВАК), автора: 0.07 пл.
4. **Nyamsuren Ch**., Liya Valeeva, Alina Achmetova, A.,Suleimanova, N. Balaban, E. Shakirov, M. Sharipova Development of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a root-specific phytase of microbial origin // FEBS Journal – 2013. – V. 280. - Suppl.1. - P. 602. doi: 10.1111/febs.12340. (перечень ВАК), автора: 0.01 пл.
5. Ахметова А.И., **Нямсурэн Ч**, Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика новой фитазы бацилл // Биоорг. химия. – 2013. – Т. 39(4). – С. 430-436. doi: 10.7868/S0132342313040039. (перечень ВАК), автора: 0.1 пл.
6. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., **Нямсурэн Ч**, Валеева Л.Р. Механизмы устойчивости растений к инфекциям // Учен. Зап. Казан. Ун-та. Сер. Естеств. науки. –2013. – Т. 155(4). – С.28-58. ISSN: 1815-6169. (перечень ВАК), автора: 0.4 пл.
7. Учебно-методическое руководство по трансформации растений / Шакиров Е.В., **Нямсурэн Ч**., Валеева Л.Р., Шарипова М.Р // Казань: – 2013. – с. 18.
8. **Нямсурэн, Ч.** Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном бациллярной фитазы / Ч. Нямсурэн, Л. Р. Валеева, А. И. Ахметова, Н. П. Балабан, Е. В. Шакиров, М. Р. Шарипова, // Сборник статей X Международной конфенренции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология». Казань: – 2013, - С.88-93.
9. **Нямсурэн, Ч.** Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana, с* бактериальным геном фитазы *Pantoae agglomerans* / Ч. Нямсурэн, Л.Р. Валеева, Д.С. Трошагина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии**:** мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 40 – 44.
10. Хабипова, Н. Н. Создание экспрессионной системы синтетического гена фитазы *Pantoea agglomerans* / Н. Н. Хабипова, Л. Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн,** Л. Р. Нигматуллина, Е. В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии**:** мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 78 – 81.
11. Валеева, Л.Р. Растения – продуценты микробных фитаз: перспективный метод биотехнологии / Л.Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн**, Д.С. Трошагина, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров // Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии**:** мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 297 – 303.

12. **Нямсурэн Ч.,** Валеева, Л.Р. Нигматуллина, Л.Р. ШакировЕ.В., Шарипова М.Р. Экспрессия бактериального гена фитазы *Bacillus ginsengihumi* в модельном растении *arabidopsis thaliana* / Ч. Нямсурэн, Л.Р. Валеева, Л.Р. Нигматуллина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // сборник «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». трудов международной научно-практической конференции. Казань: – 2014. – С. 32.

13. Валеева, Л.Р**.** Экспрессия гена микробных фитаз в корнях растений как решение проблемы недостатка фосфора в почвах / Л.Р**.** Валеева**, Ч. Нямсурэн,** Л.Р. Нигматуллина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». Казань: – 2014. – С. 52.

14. Трошагина, Д.С. Фитаза *Pantoea agglomerans*: экспрессия в *arabidopsis thaliana* под контролем вирусного промотора / Д.С. Трошагина, Л.Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн** // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». Казань: – 2014. – С. 65.

15. Валеева, Л.Р**.** *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном фитазы *Bacillus ginsengihumi* / Л.Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн** // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная «Пущинская школа-конференция молодых ученых» Сборник тезисов. Пущино: – 2014. – С. 13-14.

16. **Нямсурэн, Ч.** Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, с микробным геном фитазы *Bacillus ginsengihumi* / Л.Р. Нямсурэн**,** А.И. Валеева, А.Д. Ахметова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // XIV молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», РАСН, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Москва: – 2014. – С. 30.

17. **Нямсурэн, Ч.** Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, секретирующих микробную фитазу *bgPhyC Bacillus ginsengihumi* / Ч. Нямсурэн**,** Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», РАСН, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Москва: – 2013. – С. 39-40.

18. Валеева, Л.Р. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, несущих ген внеклеточной фитазы bgPhyC из почвенной бактерии *Bacillus ginsengihumi* / Л.Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн** // Тезисы докладов XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: «Ломоносов», Москва: – 2013. – С. 81-82.

19. Валеева, Л.Р. Получение растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном микробной фитазы / Л.Р. Валеева, **Ч. Нямсурэн,** Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // сборник тезисов X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и Биотехнология». Казань: – 2013. – С. 207-208.

20. **Нямсурэн, Ч.** Гетерологичная система экспрессии генов на основе гена фитазы бацилл / Ч. Нямсурэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов 17-я Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пущино: – 2013. – С.358-359.

21. **Нямсурэн, Ч.** Гетерологичная система экспрессии генов в растениях на основе гена бациллярной фитазы / Ч. Нямсурэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» Москва: – 2013. – С. 212-213.

22. Хабибрахманова, Л.Х. Модернизация like экспрессионной системы / Л.Х. Хабибрахманова, **Ч. Нямсурэн,** А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине III международная научно-практическая конференция.» СБОРНИК ТЕЗИСОВ. Казань: – 2012. – С. 389 – 390.

23. **Нямсурэн, Ч.** Оптимизация новой системы экспрессии *Bacillus subtilis* / Ч. Нямсурэн, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине III международная научно-практическая конференция. Казань: – 2012. – С. 257.

24. Khabibrakhmanova, L. K. Development of novel like expression system via heterologous signal peptides screening / L. K. Khabibrakhmanova, **Ch. Nyamsuren,** A.A. Toymentseva, M.R. Sharipova // “State of the art trends of scientific research of artificial and natural nanoobjects” STRANN-2012. St.burg: – 2012. – C. 26.

25. **Нямсурэн Ч.,** Тойменцева А.А., Шарипова М.Р. Модификация новой бактериальной системы экспрессии на основе подбора сигнального пептида / Ч. Нямсурэн, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Материалы Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012». Москва: – 2012. – С. 161.

26. **Нямсурэн, Ч.** Тойменцева А.А., Шарипова М.Р. Конструирование системы экспрессии для *B.subtilis* на основе Lia- промотора // XI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентовнаучно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета "Материалы и технологии XXI века". Казань: – 2012. – С. 51.

27. **Nyamsuren, Ch**. Study of the impact of major transcription factors on gene expression of serine proteases from Bacillus pumilus 3-19 by using fusion-design / Ch. Nyamsuren, O.N. Igonina, A.V. Goncharova // Bachelor, master and Phd Students III Annual international Scientific conference in biology Dedicated to academician PerteKometiani. Tibilisi: – 2011. – P. 68.

28. **Нямсурэн, Ч**. Исследование влияния основных факторов транскрипции на экспрессию генов сериновых протеаз *Bacillus pumilus* 3-19 / Ч. Нямсурэн, О.И. Игонина, А.В. Гончарова, А.А. Тойменцева, Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарипова // X Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентовнаучно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета"Материалы и технологии XXI века". Казань: – 2011. – С. 77.

29. **Нямсурэн, Ч.** Экспрессия fusion–конструкция на основе гена бетта-галактозидазы под промотором гена глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* / Ч. Нямсурэн, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского (приволжского) федерального университета. Казань: – 2011. – С.15 .

E-mail автора: chuka_ch@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.