

ЗАВИСИМОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ У РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ОСОБЕННОСТЕЙ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА

А.Н. Дерябин, Н.В. Астахова, Г.П. Алиева, Т.И. Трунова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, trunova@ippras.ru

Аннотация. Изучали влияние экспрессии гена *SUC2*, кодирующего инвертазу *Saccharomyces cerevisiae* (апопластный вариант локализации фермента) на морфологические, физиологические и биохимические показатели трансформированных растений картофеля (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée). Повышенная активность дрожжевой инвертазы увеличивала содержание сахаров в апопласте, листьях и корнях трансформированных растений, что привело к изменению их морфометрических и физиологических параметров. Наши данные свидетельствуют о повышенной устойчивости трансформированных растений к различным низкотемпературным условиям.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, инвертаза, низкая температура, *SUC2* ген, сахара
DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-259-263

Низкотемпературная адаптация – процесс формирования свойств морозо- или холодостойкости растений в соответствующих генотипу условиях – включает изменение гомеостаза, в целом и, в частности, перепрограммирование углеводного метаболизма [Nägele et al., 2011]. Одним из обязательных условий развития максимальной морозо- и холодостойкости является накопление в тканях соответствующих растений достаточного для этого процесса содержания сахаров [Трунова, 2007]. Культивируемые *in vitro* растения представляют удобную модель для изучения как углеводного метаболизма (в силу возможности направленной модификации состава и содержания сахаров в среде выращивания), так и действия различных стресс-факторов (в том числе, низкой температуры), избегая отрицательного влияния факторов окружающей среды. Поддерживаемые *in vitro* растения находятся в строго контролируемых по фотопериоду, освещенности, температуре, влажности воздуха и др. параметрам, условиях. В данной работе изучали основные закономерности, обуславливающие формирование повышенной холодостойкости растений картофеля, как типичного представителя группы холодостойких растений, с выявлением роли ключевого фермента углеводного метаболизма – инвертазы (К.Ф. 3.2.1.26) клеточных стенок (апопластная инвертаза) в этом процессе. Изменение содержания сахаров в тканях достигалось тремя способами: 1) модификацией углеводного состава среды выращивания растений, 2) длительной экспозицией растений при низкой закаливающей температуре и, 3) использованием трансформанта с конститутивно повышенным содержанием сахаров в вегетативных органах.

Объектами исследования служили растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Дезире) (далее WT-растения) и полученная на их основе линия со встроенным целевым геном *suc2*, кодирующим белок инвертазы *Saccharomyces cerevisiae* (далее *B33-inv*-растения). В экспрессионном векторе ген *suc2* находился под контролем пататинового промотора *B33* класса I и был слит с последовательностью лидерного пептида ингибитора протеиназы II картофеля, обеспечивающего апопластную локализацию дрожжевой инвертазы. *B33-inv*-растения были получены с помощью агробактериальной трансформации, отобраны *in vitro* на МС-среде с канамицином и проверены на экспрессию трансгена методом Northern блот-гибридизации [Sonnwald et al., 1997]. Растения картофеля выращивали в пробирках при 22 °С и 16-ч световом дне (мощность светового потока 100 мкмоль квантов/(м²·с)) в течение 5 недель на МС-

среде, дополненной сахарозой (0, 2 или 4%), pH 5,8. Для оценки функционального состояния растений был использован комплекс параметров, широко применяемых в современных эколого-физиологических исследованиях, такие как ростовые показатели, активность в листьях различных типов инвертазы, содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы, интенсивность фотосинтеза и дыхания, фотоморфометрия ультраструктурных элементов хлоропластов, а также стресс-маркеры – степень проницаемости мембран для электролитов и содержание малонового диальдегида (МДА), как одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

У *B33-inv*-растений была подтверждена встройка полной последовательности переносимого трансгена в ядерный геном, экспрессия дрожжевого гена *suc2* и выявлена высокая активность целевого белка – дрожжевой инвертазы, находящейся в апопласте в растворимой форме [Дерябин и др., 2014; Deryabin et al., 2016, 2018]. При этом собственная апопластная инвертаза картофеля ионно-связана с клеточной стенкой [Roitsch et al., 2003]. Инвертаза клеточных стенок регулирует многие процессы, такие как, флоэмную разгрузку, концентрацию сахарозы в свободном пространстве (апопласте) и её транспорт через плазмалемму [Fotopoulos, 2005]. Благодаря использованию *B33-inv* растений была установлена важная роль инвертазы клеточных стенок в изменении баланса между процессами фотосинтеза и оттоком ассимилятов во флоэму, приведшем к накоплению в тканях трансформантов сахаров, и как следствие, снижению морфометрических, ростовых и фотосинтетических показателей, что обусловило повышенный уровень их конститутивной холодоустойчивости [Deryabin et al., 2005, 2018].

Результатом конститутивной экспрессии гена *suc2* явилось уменьшение числа и размера структурных элементов хлоропластов, что согласуется с отставанием в росте и снижением скорости фотосинтеза у трансформантов, по сравнению с WT-растениями. Увеличение внутриклеточной концентрации сахаров у *B33-inv*-растений привело к формированию ксероморфной ультраструктуры хлоропластов, особо выраженной при низкотемпературном закаливании, что обеспечивало трансформантам пониженную холодочувствительность фотосинтетического аппарата. У WT-растений, в отличие от трансформантов, при снижении температуры процесс фотосинтеза находился в компенсационной точке. Возможно, более высокие значения скорости фотосинтеза у *B33-inv*-растений можно объяснить более выраженным подавлением нарастания сухой массы листьев, на г которых производился расчет фотосинтеза.

В наших исследованиях одним из приёмов изменения концентрации внутриклеточных сахаров в вегетативных органах была использована 6 суточная экспозиция растений картофеля на свету при низкой закалывающей температуре 5 °С. В этих условиях у обеих линий растений выявлены высокая степень изменений в листьях состава пигментов, ультраструктурной организации хлоропластов и параметров углеводного метаболизма. При этом пигментный аппарат *B33-inv* растений показал более высокую устойчивость к охлаждению, т.к. отношение хл *a* к хл *b* у них уменьшилось на 15%, а у WT-растений на 45%. Установлена положительная корреляция ($r = 0,90-0,99$) между активностью инвертазы клеточных стенок и содержанием глюкозы, что свидетельствует о сопряженности этих процессов. При низкотемпературном закаливании происходило накопление сахаров в вегетативных органах, которые в порядке возрастания их содержания можно расположить следующим образом: стебель, корни, листья. В итоге, суммарная концентрация сахаров в листьях и апопласте трансформантов была почти на треть выше, чем у WT-растений, что является существенным для выживания в условиях действия низких температур. Установлена высокая отрицательная корреляция ($r = -0,80$) между содержанием сахаров в корнях и листьях, подтверждающая активное поступление сахаров из

питательной среды и свидетельствующая о важности у холодостойких растений перераспределения растворимых сахаров в пользу надземной части (листья), по сравнению с подземными органами (корень).

Низкие положительные температуры не интенсифицировали свободно-радикальные реакции в листьях картофеля обеих линий. Поэтому были подобраны режимы охлаждения, позволившие ранжировать линии в зависимости от степени их холодостойкости. После низкотемпературного закаливания растения обеих линий повышали свою устойчивость к последующему жёсткому охлаждению, при этом *B33-inv*-растения приобретали бóльшую устойчивость (на основании данных по накоплению в листьях МДА, а также выживаемости растений спустя 1 сутки после тестирующего промораживания), что свидетельствует о меньших повреждениях их мембран и бóльших репарационных возможностях. В условиях действия пониженной температуры в листьях *B33-inv*-растений, по сравнению с WT-растениями, наблюдали меньшую интенсивность ПОЛ и активность СОД. Данные по электропроводности тканей листьев подтвердили полученные ранее результаты и свидетельствовали о повышенной холодоустойчивости трансформантов, по сравнению с WT-растениями. В последствии различных режимов жёсткого краткосрочного охлаждения (без льдообразования) наблюдали транзитное изменение содержания МДА с менее выраженным эффектом у *B33-inv*-растений. Характер изменений показателей холодоустойчивости зависел от интенсивности и продолжительности действия низкой температуры и был менее выражен у трансформантов, ткани которых более обогащены сахарами [Deryabin et al., 2005; Дерябин и др., 2016].

Углеводная модификация среды выращивания показала прямую зависимость активности цитоплазматической инвертазы (в отличие от апопластной и вакуолярной инвертаз) от уровня эндогенных сахаров (при оптимальной для роста температуре). Установлена ведущая роль цитоплазматической инвертазы в изменении внутриклеточного состава сахаров при модификации углеводного состава среды выращивания. Содержание МДА в листьях при охлаждении растений также зависело не только от экспрессии гена *suc2*, но и от концентрации сахарозы в среде выращивания. Отсутствие сахаров в среде приводило к накоплению МДА, и наоборот, наличие экзогенной сахарозы (2-4%) снижало содержание МДА. При действии и в последствии низкой повреждающей (отрицательной) температуры активность всех типов инвертаз имела обратную зависимость от внутриклеточной концентрации глюкозы и сахарозы. Установлено, что холодоустойчивость растений имела нелинейную обратную зависимость от концентрации внутриклеточных сахаров, опосредованной уровнем сахарозы в среде выращивания.

Полученные данные свидетельствуют, что один из механизмов повышения холодоустойчивости растений связан с активацией инвертазы клеточных стенок и накоплением сахаров (глюкозы и сахарозы) в листьях (как в клетках, так и в апопласте) и корнях. Показана способность сахаров стабилизировать структурно-функциональное состояние клеточных мембран и снижать интенсивность свободнорадикальных процессов, как конститутивно, так и в условиях низкотемпературного стресса. Следовательно, накапливаемые конститутивно и при действии низкой температуры сахара регулировали процесс формирования холодоустойчивости. Известно, что концентрация сахаров в клетках растений является одним из факторов, влияющих на экспрессию генома. Сахара способны избирательно усиливать либо ослаблять биосинтез метаболитов (белков, липидов, органических кислот и др.), что сказывается на проявлении такого признака, как устойчивость растения к низкой температуре. Следовательно, индуцируемая низкой температурой активность инвертазы клеточных стенок приводила к изменению апопластного и внутриклеточного состава сахаров, что

позволяет рассматривать ее в качестве стрессового фермента углеводного обмена, участвующего в процессе формирования повышенной устойчивости холодостойких растений. В условиях действия низкой температуры уровень сахаров в клетках растений оказывал регулирующее воздействие на интенсивность свободно-радикальных процессов, морфофизиологические процессы (рост, фотосинтез, дыхание, структуру хлоропластов и др.) и, в целом, процесс формирования холодоустойчивости [Deryabin et al., 2016, 2018; Deryabin, Trunova, 2016, 2017].

Сделано заключение, что изменение активности только одного фермента углеводного метаболизма, инвертазы клеточных стенок, существенно перестраивает метаболические процессы у растений и способствует увеличению уровня их холодоустойчивости. Увеличение активности инвертазы клеточных стенок в условиях действия низких температур следует рассматривать как часть катаболического процесса, являющегося одним из составляющих стрессовой реакции растений. При этом сам фермент выполняет важную регуляторную функцию в модификации внутриклеточного состава сахаров, учитывая, что субстрат инвертазы клеточных стенок (сахароза), а также продукты реакции гидролиза (глюкоза, фруктоза) являются активными полифункциональными метаболитами, оказывающими существенное влияние на процесс формирования холодоустойчивости у растений. Полученные результаты указывают на важную роль апопластной инвертазы в индукции устойчивости растений картофеля к низкой температуре.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований. Авторы благодарны сотрудникам Лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН и группе доктора Lothar Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Германия) за предоставленные для исследований растения картофеля.

Литература

Дерябин А.Н., Бердичевец И.Н., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Характеристика внеклеточной инвертазы *Saccharomyces cerevisiae* в условиях гетерологичной экспрессии гена *suc2* в растениях *Solanum tuberosum* // Известия РАН. Серия биологическая. – 2014. – № 1. – С. 22–29.

Дерябин А.Н., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Участие апопластной инвертазы в формировании устойчивости холодостойких растений к гипотермии // Известия РАН. Серия биологическая. – 2016. – № 1. – С. 32–40.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс (64-е Тимирязевские чтения). – М.: Наука. – 2007. – 54 с.

Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Sabel'nikova E.P., Trunova T.I. Influence expressing yeast-derived invertase gene in potato plants on membranes lipid peroxidation at low temperature // Journal of Thermal Biology. – 2005. – V. 30, – № 1. – P. 73–77.

Deryabin A.N., Berdichevets I.N., Burakhanova E.A., Trunova T.I. Apoplastic expression and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast invertase in transgenic potato plants // Annals Biological Research. – 2016. – V. 7(5). – P. 62–69.

Deryabin A.N., Trunova T.I. The physiological and biochemical mechanisms providing the increased constitutive cold resistant in the potato plants, expressing the yeast *suc2* gene encoding apoplastic invertase // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2016. – V. 12. – P. 39–52.

Deryabin A., Trunova T. Transformation of the *Solanum tuberosum* with *Saccharomyces cerevisiae* gene *suc2* encoding cell-wall invertase influences on sugars distribution in plants // Focus on Sciences. – 2017. – V. 3(2). – P. 1–4.

Deryabin A., Berdichevets I., Trunova T. Constitutively expressing of the *suc2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding of invertase apoplastic localization in potato plants results in multiple physiological and biochemical changes associated with low temperature resistance // Journal of Plant Chemistry and Ecophysiology. – 2018. – V. 3(1). – P. 1–6.

Fotopoulos V. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family // Journal Biological Research. – 2005. – V. 4. – P. 127–137.

Nägele T., Kandel B.A., Frana S., Meissner M., Heyer A.G. A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Journal. – 2011. – V. 278. – P. 506–518.

Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M., Proels R., Sinha A.K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54. – P. 513–524.

Sonnewald U., Hajlrezaei M.-R., Kossmann J., Heyer A., Thethewey R.N., Willmitzer L. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase // Nature Biotechnology. – 1997. – V. 15(8). – P. 794–797.

DEPENDENCE OF THE COLD RESISTANCE OF POTATO PLANTS FROM THE CHARACTERISTICS OF CARBOHYDRATE METABOLISM

A.N. Deryabin, N.V. Astakhova, G.P. Alieva, T.I. Trunova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia, trunova@ippras.ru

Abstract. We studied the influence of the expression of *SUC2* gene encoding invertase of the *Saccharomyces cerevisiae* (apoplastic version of enzyme localization) on morphological, physiological and biochemical traits of transformed potato plants (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée). It was shown that invertase activity increased the sugars content in the apoplast, leaves and roots of the transformed plants and led to changes in their morphometric and physiological parameters. Our data indicate higher resistance of transformed plants to severe low temperature conditions.

Keywords: *Solanum tuberosum*, invertase, low temperature, *SUC2* gene, sugars