

## ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

*Е.Н. Баранова, А.А. Гулевич, Л.В. Куренина, Н.В. Кононенко, И.А. Чабан*  
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, e-mail: inna\_chaban@rambler.ru

Одним из наиболее значимых стрессовых воздействий является окислительный стресс, вызывающий генерацию активных форм кислорода, которые являются токсичными для растительных клеток и их компартментов. Он индуцирует модификацию состава и формы мембран их целостность и синтез, что находит отражение в функционировании как отдельных компартментов, так и в целом системы органелл клетки. Для нейтрализации этих токсичных соединений растения выработали целый ряд защитных механизмов. Например, возрастание активности ферментов-нейтрализаторов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АсП), глутатионредуктаза (ГР) и другие, а также синтез низкомолекулярных антиоксидантов (Mittler, 2002). Внедрение генов, кодирующих синтез антиокислительных ферментов, - перспективный способ получения растений, обладающих толерантностью ко многим стрессам (Singla-Pareek et al., 2007). Известно, что повышенной устойчивостью к окислительному стрессу могут обладать растения-трансформанты, с суперэкспрессией генов супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и др. (McKersie et al., 1996; Badawi et al., 2004). Установлено, что СОДы хлоропластов играют роль в предотвращении нарушения фотосинтеза, вызываемого окислительным повреждением (Alscher et al., 2002). Остаются малоизученными многие аспекты, связанные с влиянием интродуцированных генов на структурную организацию клеточных органелл. Ранее нами был получен ряд независимых трансформантов томата, у которых имелись различия в ультраструктуре хлоропластов и активности ферментов: СОД и АСП. Ранее мы продемонстрировали, что при таргетинге фермента FeSOD1, ответственного за первые этапы нейтрализации активных форм кислорода, происходит: изменение пигментного комплекса (Широких и др., 2014), структурной организации пластид: структуры тилакоидов стромы, размера пластоглобул и крахмальных зерен, а также ламеллярных образований рядом с нуклеоидами в хлоропластах трансгенных растений (Baranova et al., 2010; Баранова и др., 2011). В условиях *in vitro* растения, особенно при использовании водной культуры, подвергаются многим специфическим воздействиям. Одним из них является перманентный анаэробный стресс, вызываемый аноксией. Изменение структурной организации митохондрий при аналогичных условиях хорошо изучены на разных культурах (Vartapetian et al., 2003). Важная роль взаимодействия митохондрий и пластид в норме и при стрессе активно обсуждается (Noctor et al., 2007).

Целью настоящей работы было получение сравнительных данных о тканеспецифичном изменении пластид и митохондрий в разных тканях у исходных и трансгенных по FeSOD1 растений томата.

**Материалы и методы.** Ранее, методом агробактериальной трансформации томата сорта Белый Налив с использованием бинарного вектора pBINFe-SOD1 было получено 15 первичных регенерантов, содержащих в своем ядерном геноме ген Fe-SOD1. Ген был снабжен сигнальной последовательностью из гена Rubisco гороха, таргетирующую синтезируемый фермент в пластиду. Для подтверждения экспрессии гена Fe-SOD1 была проведена ПЦР-диагностика (Serenko et al., 2009), сопряженная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). По результатам ОТ-ПЦР-анализа экспрессия гена Fe-SOD1 была подтверждена у 7 из 15 трансгенных линий.

Трансгенные линии томата, экспрессирующие целевой ген, были размножены в условиях *in vitro*, адаптированы к почвенным условиям и выращены в грунте для получения семенного поколения. В процессе выращивания Т0-трансгенные линии были проанализированы на предмет соматических отклонений от контрольных растений сорта «Белый налив». Установлено, что у ряда линий наблюдались изменения формы и размера листовой пластинки, а также различия в габитусе по сравнению с контролем. Кроме того, показано, что у 3 трансгенных линий происходило отмирание цветков, в результате чего не происходило формирование плодов. После длительного культивирования на этих растениях были получены плоды. Однако они не содержали полноценных семян. Вместо них обнаруживались только мелкие неразвившиеся семязачатки, что свидетельствует о партенокапическом происхождении плодов у этих растений. Размноженные растения подвергали действию солей NaCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в культуре *in vitro* на бумажных мостиках на водной среде ½ MS без добавления гормонов. Электронная микроскопия проводилась по стандартному протоколу.

**Результаты и обсуждение.** Нетрансгенные растения томата имели характерные для действия солевого стресса изменения ультраструктуры паренхимных клеток, что было характерно как для пластид, так и для митохондрий. Очевидно, что действие NaCl оказывало деструктивное влияние на структуру пластид, что выражалось в изменении их формы, вероятно связанных с нарушением осмоса, появлении увеличенных пластоглобул. Повреждение митохондрий выражались в значительном уменьшении количества крист и в их неравномерном расположении, изменении формы с округлой на сильно изогнутую, с инвагинациями. При воздействии Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> пластиды исходной формы приобретали неправильную угловатую форму, строма была более плотной, крахмальные зерна окружали неравномерные угловатые светлые участки, от отдельных пластид отшнуровывались окруженные мембраной фрагменты стромы, содержащие ламеллярные структуры, увеличения количества пластоглобул при этом не наблюдалось. Митохондрии были более мелкими, чем в контроле, сохраняли округлую форму и имели небольшое число более длинных, чем в норме, изогнутых крист. Пластиды клеток паренхимы трансгенных линий № 6 и № 8 значительно отличались как от контроля, так и между собой. Пластиды линии № 6 под действием NaCl не имели характерных крупные пластоглобул, изменялась форма пластиды и ее размер, можно было наблюдать нуклеоид, крахмальные зерна сохранялись в некоторых клетках, количество гран оставалось также ниже, чем у исходной формы и линии № 8. Митохондрии линии № 6 при хлоридном засолении были более мелкими, хотя и содержали характерные для нормальных условий для этой линии кристаллические включения, кристы были четко выражены, имели ромбовидную и треугольную форму, плотный матрикс. Изменение митохондрий вероятно, было обратимым. Сульфатное засоление вызывало изменение пластид линии № 6: уменьшение размеров, сохранение значительного количества крахмальных зерен, появление пластоглобул, меньшего, чем в норме для этой линии, но соответствующего размеру пластоглобул у исходной формы и трансгенной линии № 8 в нормальных условиях. Митохондрии линии № 6 в этих условиях не имели значимых изменений структуры. Во многих клетках приобретали характерное для контрольных условий структурное состояние. Ультраструктура хлоропластов линии № 8 имела существенные отличия по сравнению, как с исходной формой, так и с линией № 6, выразившиеся в сохранении овально-линзовидной формы при действии NaCl. Тилакоиды гран и стромы также имели типичное строение, в строме наблюдали небольшое число нуклеоидов и пластоглобул, что свидетельствовало о сохранности компартмента. Митохондрии клеток паренхимы линии № 8 при хлоридном засолении характеризовались округлой формой, имели развитую структуру крист, несколько большие размеры, чем в нормальных условиях у этой линии, но соответствующую структуре митохондрий у исходной формы без воздействия солей. При сульфатном засолении пластиды линии № 8 были меньше, отмечали незначительные изменения формы, уменьшение количества гран и

тилакоидов в гранах, пластоглобулы – более мелкие. Под действием сульфата натрия митохондрии линии № 8 приобретали овальную продолговатую форму, содержали относительно плотный матрикс и развитую систему крист, структура была аналогична структуре митохондрий у линии № 6 в нормальных условиях. В проведенных экспериментах подтвердилось предположение, что устойчивость к повреждениям при действии засоления, вызываемого сульфатом и хлоридом натрия, на уровне реакции ультраструктуры зависит от активности фермента и принадлежности клетки к определенной ткани.

*\*Работа проведена в рамках РФФИ 18-04-00558 и госзадания № 0574-2014-0019.*

#### Литература

*Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in plant science. – 2002. – Т. 7, №. 9. – С. 405–410.

*Singla-Pareek S.L., Pareek A., Sopory S. K.* Transgenic plants for dry and saline environments // Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. – Springer, Dordrecht, 2007. – С. 501–530.

*Mckersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O.* Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase // Plant Physiology. – 1996. – 111 (4). – P. 1177–1181.

*Badawi G.H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K., Tanaka K.* Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts // Plant Science – 2004. – 166 (4). – С. 919–928.

*Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.* Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // Journal of experimental botany. – 2002. – Т. 53, № 372. – С. 1331–1341.

*Широких И.Г., Бакулина А.В., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н., Лундовских И.А., Гулевич А.А.* Влияние встройки Fe-SOD1 гена на рост, перекисный гомеостаз и состояние пигментного комплекса трансгенных растений картофеля // Агрехимия. – 2014. – № 8. – С. 72–78.

*Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N.* Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with FeSOD1 gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242–249.

*Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В.* Ультраструктурная организация клеток трансгенных растений томата с геном Fe-SOD при засолении питательной среды // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 90–97.

*Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y.* Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress // Annals of Botany – 2003. – 91 (2). – С. 155–172.

*Noctor G., De Paere R., Foyer C.H.* Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants // Trends in plant science – 2007. – 12 (3). – С. 125–134.