

ВВЕДЕНИЕ ГЕНА *DES A* Δ 12-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ *SYNECHOCYSTIS* ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРУ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ КАРТОФЕЛЯ К ГИПОТЕРМИИ

Н.В. Нарайкина, Н.В. Астахова, Т.И. Трунова

Институт физиологии растений РАН, Москва, e-mail: narai@yandex.ru

Устойчивость и адаптация растений к низкой температуре является многокомпонентным процессом и рассматривается как одна из фундаментальных проблем физиологии растений. Несмотря на существенные достижения в этой области, остаются недостаточно исследованными механизмы формирования устойчивости при закаливании растений, относящихся к группе холодостойких, которые, в отличие от теплолюбивых, переносят любые низкие температуры вплоть до замораживания и отличаются от морозостойких растений тем, что гибнут при образовании в них льда.

Поскольку механизмы повреждения холодостойких, теплолюбивых и морозостойких растений неодинаковые, можно предположить у первых наличие особенностей и в процессах закаливания к низкой температуре (НТ), направленных на сохранение функциональной активности клеток при НТ. Такие особенности, прежде всего, могут быть связаны с поддержанием нативности клеточных мембран в условиях НТ, так как хорошо известно, что одной из важнейших причин повреждения растений НТ является фазовый переход мембранных липидов из жидко-кристаллического состояния в гель.

Для поддержания функций мембран у растений, имеющих прикрепленный образ жизни, выработан механизм снижения температуры плавления за счет изменения состава липидов путем увеличения в них доли полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Известно, что повышение содержания ненасыщенных ЖК, т. е. образование двойных связей в молекулах насыщенных ЖК, входящих в состав мембранных липидов, происходит в результате активации ферментов-десатураз ЖК, превращающих одинарные (С-С) связи между атомами углерода в ацильных цепях в двойные (С=С) (Лось, 2001; Wada et al., 1990). Роль десатураз ЖК в устойчивости к гипотермии хорошо изучена на примере одноклеточных синезеленых водорослей *Synechocystis* (Лось, 2014), однако у высших растений этот вопрос исследован недостаточно. В связи с этим изучение изменений жирнокислотного состава мембранных липидов при низкотемпературной адаптации (закаливание) имеет большое значение для понимания физиологических процессов, обеспечивающих формирование устойчивости растений к НТ.

Другим важным функциональным показателем закаливания растений к НТ является активность и устойчивость их фотосинтетического аппарата. Установлено, что среди органелл (ядро, митохондрии, пластиды) растительной клетки первыми на НТ реагируют хлоропласты (Kratch, Wise, 2000). Однако вопрос об адаптации ультраструктуры и мембран хлоропластов в результате низкотемпературного закаливания, в том числе у трансформированных растений картофеля с повышенным содержанием липидов, остается мало исследован.

В связи с этим целью настоящей работы состояла в изучении у растений картофеля изменений ультраструктурной организации хлоропластов и уровня устойчивости к гипотермии индуцируемые низкой закалывающей температурой и введением гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий.

Использовали нетрансформированные растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Десница (контроль) и трансформированные геном *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий (*desA-lic*ВМЗ растения). Растения размножали черенкованием, выращивали на нейтральном субстрате (перлит) при 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль квантов/(м²с) в течение 8 недель. Закаливание проводили при температуре 5°C, в течение 6 дней, на свету. С помощью метода прямого промора-

живания целых растений и определения выхода электролитов из листьев (Нарайкина и др., 2016) показано повышение устойчивости картофеля в результате низкотемпературного закаливания. При этом трансформанты имели достоверно более высокую устойчивость по сравнению с контролем. Кроме того, изучение влияния низкотемпературного закаливания на развитие окислительного стресса (ОС) и активность антиоксидантных ферментов клеток (Нарайкина и др., 2014), не выявили у растений картофеля развивающегося в этих условиях ОС и перекисного окисления липидов, что также свидетельствует о достаточно высокой устойчивости мембранной системы клеток исследуемых растений к НТ.

С помощью методов электронной микроскопии и морфометрии было показано, что в результате закаливания контрольных растений, по сравнению с незакаленными, площадь среза хлоропласта и общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на 1 хлоропласт, снижались почти на 40%, тогда как общая площадь пластоглобул (площадь пластоглобулы × число пластоглобул в одном хлоропласте) и общее число тилакоидов (число гран × число тилакоидов в одном хлоропласте) увеличивались на 80 и 35 %, соответственно (табл. 1). Увеличение количества мембран и пластоглобул свидетельствует о сохранении интенсивности липидного метаболизма при снижении температуры.

Таблица 1

Изменения ультраструктурной организации хлоропластов контрольных и *desA-licVM3* растений картофеля после закаливания при 5±0,5°C, 6 суток

Объект	Вариант опыта	Площадь хлоропласта (мкм ²)	В одном хлоропласте		
			Общая площадь		Общее число тилакоидов
			Крахмальных зерен (мкм ²)	Пластоглобул (мкм ²)	
контроль	22±0,5°C	8,98 ± 0,16	3,08 ± 0,11	0,07 ± 0,005	86 ± 3,65
<i>desA-licVM3</i>		9,05 ± 0,19	2,63 ± 0,08	0,08 ± 0,006	154 ± 7,08
контроль	5±0,5°C	6,98 ± 0,23	1,91 ± 0,05	0,15 ± 0,008	112 ± 6,23
<i>desA-licVM3</i>		6,04 ± 0,30	2,71 ± 0,07	0,14 ± 0,014	152 ± 6,76

Что касается трансформантов, то они уже до закаливания отличались от контроля почти вдвое большим числом тилакоидных мембран. После закаливания достоверных изменений мембран хлоропластов *desA-licVM3* растений не выявлено, но общее число тилакоидов у них оставалось ~ на 35 % выше, по сравнению с контролем. Общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на один хлоропласт, также оставалась выше у трансформантов, т. е. они имели больше запасных углеводов к концу закаливания.

О функциональной активности хлоропластов в процессе закаливания свидетельствуют данные по содержанию сахаров в листьях. Как видно из табл. 2, в период закаливания контрольных и трансформированных растений происходило повышение количества исследованных сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы) более чем в 3,5 раза.

Важно отметить, что у *desA-licVM3* растений уже в первые сутки закаливания наблюдали резкое повышение содержания сахаров (глюкозы – в 2 раза, сахарозы – в 5 раз). После шести суток закаливания содержание фруктозы в листьях контрольных растений возросло почти в 44 раза, а в листьях *desA-licVM3* растений – только в 6 раз. Отсутствие заметных изменений в содержании фруктозы у трансформантов, скорее всего, объясняется большим вовлечением ее в метаболизм.

Таким образом, при закаливании картофеля, как типичного представителя холодостойких растений, в ультраструктуре хлоропластов происходят изменения, свидетельствующие об их адаптации к действию НТ. При этом хлоропласты трансформантов уже до закаливания обладали некоторыми признаками закаленных растений, например, отличались большим числом тилакоидных мембран. Это свидетельствует о важной роли липидного метаболизма и, вероятно, способствует поддержанию функциональной активности и снижению повреждений фотосинтетического аппарата, особенно в начале

низкотемпературного закаливания, о чем свидетельствует резкое повышение сахаров уже после первых суток действия НТ у трансформированных растений.

Таблица 2

Изменение содержания растворимых сахаров у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при температуре $5 \pm 0,5$ °C в течение 6 суток, мг/г сырой массы

Сахара	До закаливания	Длительность закаливания, суток		
		1	3	6
Контрольные растения				
Фруктоза	$0,20 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,10$	$4,68 \pm 0,32$	$8,73 \pm 0,84$
Глюкоза	$3,41 \pm 0,35$	$4,84 \pm 0,43$	$5,64 \pm 0,58$	$8,52 \pm 0,74$
Сахароза	$2,97 \pm 0,40$	$6,15 \pm 0,81$	$9,22 \pm 1,67$	$13,06 \pm 1,46$
Σ сахаров	$6,58 \pm 0,84$	$11,49 \pm 1,12$	$19,54 \pm 1,81$	$25,31 \pm 2,80$
<i>DesA-licBM3</i> растения				
Фруктоза	$1,05 \pm 0,30$	$2,7 \pm 0,54$	$1,35 \pm 0,26$	$6,43 \pm 0,83$
Глюкоза	$3,15 \pm 0,56$	$6,37 \pm 0,83$	$6,80 \pm 0,75$	$6,39 \pm 0,94$
Сахароза	$2,13 \pm 0,60$	$10,30 \pm 1,25$	$10,69 \pm 2,90$	$10,44 \pm 1,77$
Σ сахаров	$6,33 \pm 1,42$	$19,37 \pm 3,23$	$18,84 \pm 2,04$	$23,26 \pm 3,41$

Литература

Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.

Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – М.: Научный мир, 2014. – 372 с.

Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Демин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ супероксиддисмутазы у растений картофеля дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 359–366.

Нарайкина Н.В., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Оценка устойчивости холодостойких растений картофеля к гипотермии // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов: Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием и школы молодых ученых. – Иркутск: Изд-во Ин-та географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016. – С. 269–270.

Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // Plant, cell and Environment. – 2000. – V. 23. – P. 337–350.

Wada H. Gombos Z. Murata N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation // Nature. – 1990. – V. 347. – P. 200–303.