

ПРОБЛЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЛАСТИД У ТРАНСГЕННЫХ И ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Е.Н. Баранова¹, С.А. Данилова¹, Г.Н. Ралдугина², А.А. Гулевич¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, e-mail: a_gulevich@mail.ru

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, e-mail: galina@ippras.ru

Согласно современным представлениям пластиды являются одним из древнейших эндосимбионтов эукариотических организмов (Gray, 2017). В результате длительного совместного эволюционного развития в клетках растений часть генома организма-предшественника пластид, которым, как полагают, была цианобактерия, так же как и часть генома организма-предшественника митохондрий была перенесена в ядерный геном и включена в состав хромосом (Li et al., 2015). Однако часть генетического аппарата сохранилась в виде нуклеоида, кодирующего элементы отличного от цитоплазматического белоксинтезирующего аппарата и ряд специфических ферментов регуляции и функционирования пластид (Wock, 2015). Для доставки важных элементов формирования компартментов пластид, в частности, связанных с фотосинтезом, используется белоксинтезирующая система, контролируемая ядром. Различные полипептиды, таргетируемые в пластиды, содержат специфические сигнальные последовательности, обеспечивающие адресную доставку (Singh et al, 2015). В пластидах осуществляется синтез множества молекул отвечающих за рост, развитие и регуляцию процессов дифференцировки растений. Процесс фотосинтеза обеспечивает накопление крахмала, который потом метаболизируется в сахара и являются важнейшим поставщиком и способом сохранения энергии, белки, витамины, гормоны и липиды также используются клеткой для обеспечения своей жизнедеятельности. Абиотические стрессовые факторы оказывают значительное влияние на структурную организацию пластид как напрямую, так и опосредованно, за счет нарушения осмотического давления, целостности мембран, ограничения таргетинга функциональных белков. Это сказывается на изменении формы, размеров, структурной организации и распределения функциональных субдоменов пластидного компартмента.

Важнейшими доменами пластидного компартмента является внешняя мембрана, нуклеоид, система внутренних ламелл, рибосомы и строма. Существующие системы классификации пластид до сих пор несовершенны и в целом предполагают деление на основе визуализируемого внутреннего содержимого. В ряде случаев это достаточно устойчивые и распространенные формы: амилопласты, лейкопласты, хлоропласты, этиопласты. Однако в большинстве случаев, очевидно, что узкая специализация пластид по сути является реакцией на взаимодействие с условиями их существования и зависит от регуляторной функции ядра.

Генетическая инженерия позволяет эффективно использовать пластиды в качестве стабилизатора клетки от повреждений абиотическими стрессорами (Fuentes P. et al, 2018). Может быть использовано две стратегии: 1) защита целостности и функциональной активности пластидного компартмента; 2) использование специализированных свойств пластиды через регуляцию ее функций. При первом варианте мы исходим из того, что хлоропласты весьма чувствительны к окислительному, осмотическому и токсическому воздействию, вызываемому избыточным ультрафиолетом, температурными стрессами, засухой, действием токсикантов. Отсюда, модификация устойчивости компартмента может быть осуществлена опосредованно, через оптимизацию работы кле-

точного метаболизма регуляцией работы других систем – локализацию токсикантов, изменение осмотического давления таким осмопротектантами как пролин, маннитол и др. При использовании второй стратегии для защиты могут быть задействованы генетически заложенные в его метаболизме возможности, например, наличие в хлоропластах холина, который при достаточно простой модификации может быть превращен в глицинбетаин не так, как у некоторых растений – в две стадии, а с использованием бактериального фермента холиноксидазы – в одну стадию. Осуществление этих двух стратегий может быть выполнено, используя генетическую модификацию одного из трех доступных геномов растительной клетки. Очевидно, что генетическая модификация митохондриального генома до сих пор представляет собой очень сложную проблему (Weber-Lotfi et al., 2015), поэтому можно выбирать между цитоплазматической системой экспрессии (контролируемой ядром) и пластидной, контролируемой как ядром так и нуклеоидом. На сегодняшний день остается много вопросов к тому, какой вариант является более эффективным, и в каком случае следует делать выбор в сторону одного или другого тактического подхода.

В качестве модельного объекта в работе использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Sumsun. Семена растений стерилизовали и помещали на агаризованную среду MS для проращивания. Через две недели семядольные листья использовали для агробактериальной и баллистической трансформации по описанным ранее методикам. Дальнейший отбор на антибиотике проводился по стандартным методикам (Baranova E.N. et al., 2010).

В нашей работе мы получили трансгенные и транспластомные растения и табака методом агробактериальной и баллистической, соответственно. После отбора на антибиотике проверяли наличие вставки методом ПЦР и РТ-ПЦР. Для анализа трансгенных линий использовали как первичные трансформанты, так и их семенное потомство. При исследовании транспластомных линий анализировали гомопластомные и гетеропластомные растения и изучили изменения пластид на нескольких линиях в сравнении с нетрансформированным контролем (Данилова С.А. и др., 2014). Выбранные варианты воздействия на ядерный и пластидный геномы показывают эффективность обоих подходов, но различия между линиями трансгенных и транспластомных растений свидетельствуют о необходимости коррекции вариантов подбора стратегии.

В конструкции для агробактериальной трансформации целевой ген был снабжен синтетической хлоропластной сигнальной последовательностью из гена *rbcS*, обеспечивающий таргетинг аминокислотной последовательности в пластиду (Гулевич, Баранова, 2008). Мы отметили наличие изменений в пластидном компартменте в обоих случаях, что выражалось в изменении расположения внутренних доменов хлоропласта, в частности, ламеллярной системы. Однако при применении стрессового воздействия у трансгенных растений изменения затрагивали также ультраструктурную организацию митохондрий и пероксисом, что возможно, может быть связано с нарушением надлежащего осуществления таргетинга в условиях стресса, что представляет самостоятельный интерес и требует дальнейшего изучения. Если это предположение подтвердится, то вероятно, нужно будет произвести отбор сигнальных последовательностей, таргетинг которых остается стабильным при стрессе, и/или использовать только транспластомные растения, как наиболее эффективные для создания защиты пластид от повреждающего действия абиотических стрессов.

Другим возможным вариантом является поддержание адресной доставки структурных и функциональных белков и ферментов путем увеличения адаптивных возможностей цитоплазмы, так как при стрессе меняется осмотическое давление в цитоплазматическом компартменте, нарушается расположение и динамика сборки и разборки филаментов и микротрубочек, нарушается процесс слияния и синтеза мембран тонопласта, в ряде случаев клеточные компартменты локализуются в аутофагосомы, что полностью ингибирует возможность доставки кодируемых в ядерном геноме продуктов

в органеллу. Кроме того, при ряде стрессовых воздействий нарушается целостность пластид и митохондрий (Баранова Е.Н. и др., 2011), нарушение внешней и внутренней мембраны, в результате чего содержимое стромы и матрикса может быть выброшено в цитоплазму или в вакуолярный компартмент (Baranova E.N. et al., 2011; Borgo L. et al., 2015).

**Работа проведена в рамках ГП 14 по теме госзадания № 0574-2015-0004 и при финансовой поддержке РФФИ 13-08-01323.*

Литература

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.

Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Создание генно-инженерной конструкции с геном холиноксидазы для улучшенной экспрессии в растениях // Российская сельскохозяйственная наука. – 2008. – № 3. – С. 7–9.

Данилова С.А., Ралдугина Г.Н., Кунакова Е.А., Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Получение и анализ хлоропластных трансформантов растений табака *Nicotiana tabacum* L. с маркерной каскадой экспрессии гена *aadA^{su}*, изменяющего окраску листа // Российская сельскохозяйственная наука. – 2014. – № 5. – С. 16–21.

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.

Baranova, E.N., Gulevich, A.A., Kalinina-Turner, E.B., Koslov, N.N. Effects of NaCl, Na₂SO₄ and mannitol on utilization of storage protein and transformation of vacuoles in the cotyledons and seedling roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Russian Agricultural Sciences. – 2011. – V. 37. – P. 11–19.

Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology // Annual Review of Plant Biology. – 2015. – V. 66. – P. 211–241.

Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // Current opinion in biotechnology. – 2018. – V. 49. – P. 10–15.

Gray M.W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later // Molecular biology of the cell. – 2017. – V. 28. – P. 1285–1287.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., Chen, S. Plant DNA barcoding: from gene to genome // Biological Reviews. – 2015. – V. 90. – P. 157–166.

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., Prasad, S.M. Retrograde signaling between plastid and nucleus: a review // Journal of plant physiology. – 2015. – V. 181. – P. 55–66.

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileshina D.V., Dietrich A., Konstantinov Y.M. Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Cell Research. – 2015. – V. 1853. – P. 3165–3181.

Borgo L., Marur C.J., Vieira L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants // Acta Scientiarum. Agronomy. – 2015. – V. 37. – P. 191–199.