

УДК 577.21+602.6

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА И СУЛЬФАТА НАТРИЯ  
НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА  
В КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЕ  
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА

Н.В. КОНОНЕНКО<sup>2</sup>, Е.Н. БАРАНОВА<sup>1-2</sup>, А.А. ГУЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Е.К. СЕРЕНКО<sup>2</sup>,  
Н.В. КУРЕНИНА<sup>2</sup>, Н.В. ЛАВРОВА<sup>1</sup>, М.А. ТРАХОЛИСОВА<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева,  
<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН)

*Методом цитофотометрического анализа определено содержание ДНК в меристематических клетках корня трансгенных по гену Fe-SOD и нетрансгенных растений томата (*Solanum lycopersicum* Mill.) под действием хлорида и сульфата натрия. Установлено, что под действием солей как у трансгенных линий, так и у контрольных растений томата увеличивается количество клеток в фазе G1 клеточного цикла и уменьшается их количество в S-фазе. Однако если у контрольных растений томата количество клеток в G1-фазе при хлоридном воздействии возросло вдвое, то у трансгенных — только на 33% по сравнению с отсутствием воздействия. Показано, что интенсивность пролиферации при стрессе снижается на 18-22% у трансгенных линий и на 26% — у контрольных растений томата.*

*Ключевые слова: солевой стресс, трансгенные растения томата, супероксиддисмутаза, клеточный цикл.*

Абиотические стрессы, такие как засуха, кислые или щелочные почвы, засоление, экстремальные температуры и др., нарушают рост и развитие растений томата, что вызывает значительное снижение его урожайности. Среди таких стрессов засоление, особенно на полузасушливых и засушливых территориях, оказывает огромное негативное влияние на возделываемые овощные культуры из-за плохого качества применяемой для орошения воды, вследствие чего происходит постепенное накопление в почве солей, и пахотные земли становятся непригодными для промышленного овощеводства. Повреждающий эффект от стресса, вызываемого засоленностью среды под овощными культурами, складывается из суммарного воздействия двух стрессовых факторов: осмотического и токсического (в т.ч. окислительного) [1]. Окислительный (оксидативный) стресс представляет собой генерацию активных видов кислорода, включая супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильный радикал [9]. Хотя активные формы кислорода являются неизбежными побочными продуктами аэробного метаболизма, они вызывают переокисление липидов томата и отсюда — повреждение мембран, деградацию белков, инактивацию ферментов, модификации оснований и разрывы в ДНК, таким образом, порождая мутации и в конечном итоге приводя к программируемой клеточной гибели [11, 12]. Для того

чтобы противостоять токсическим эффектам ROS, клетки томата используют целый ряд защитных механизмов, чтобы воспринимать и реагировать соответствующим образом на окислительный стресс. Эти защитные механизмы вовлекают и низкомолекулярные антиоксиданты (глутатион, аскорбиновую кислоту, токоферол), и антиокислительные ферменты (супероксиддисмутазы, каталазы, редуктазы, пероксидазы) [9].

Другим важным ответом клеток и тканей, подвергшихся солевому, а следовательно, и окислительному стрессу, является их способность останавливать клеточное деление. Так, хлорид натрия (0,2 М) увеличивал время появления первых митозов, вызывал снижение МИ и удлинение клеточного цикла в корнях сорго [3]. Солевой стресс также значительно снижал митотический индекс в клетках корня проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) [15]. Условия сильного засоления ингибируют рост корней *A. thaliana* L., снижая пул делящихся клеток в меристеме [6, 18]. Подобным же образом в листьях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) водный стресс уменьшает размер меристемы и удлиняет продолжительность клеточного цикла в результате снижения активности циклинзависимых киназ (CDK) [14, 7]. ROS и окислительный стресс нарушают репликацию ДНК и замедляют вхождение в митотический цикл у клеток BY-2 табака и в апикальной корневой и побеговой меристемах табака [13].

Растительные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, показывают временную остановку клеточного цикла, замедленную репликацию ДНК и задержки при переходах от фазы G1 к S и от G2 к M [13]. Такие задержки на специфических контрольных точках клеточного цикла, таких как G1/S и G2/M, связаны с временным подавлением экспрессии ряда генов клеточного цикла [10] и, как полагают, предоставляют время для репарации повреждений. Таким способом хорошо адаптировавшиеся к стрессу растения томата могут восстанавливать нормальный рост и при продолжительном стрессе.

В настоящее время, благодаря развитию современных методов биотехнологии, например генетической трансформации, можно искусственно повысить адаптацию растений к окислительному стрессу, являющемуся составной частью подавляющего большинства абиотических и биотических стрессов. Генетическая трансформация позволяет получать трансгенные растения, в которые перенесены гены, кодирующие ферменты, либо непосредственно нейтрализующие ROS, либо отвечающие за синтез низкомолекулярных антиоксидантов. Ранее сообщалось, что экспрессия различных генов супероксиддисмутаз в трансгенных растениях повышала толерантность к стрессу у нескольких растительных видов [16, 17].

Супероксиддисмутазы (СОД) — это ферменты, осуществляющие реакцию дисмутации супероксид-аниона в перекись водорода, которая, в свою очередь, детоксицируется в растительной клетке различными каталазами и пероксидазами [8]. Ранее нами были получены трансгенные растения томата и табака, экспрессирующие ген Fe-зависимой супероксиддисмутазы [4, 5]. Отобранные линии томата, различавшиеся по морфологическим признакам, отличались также как по уровню активности СОД и аскорбатпероксидазы, так и по ультраструктурной организации хлоропластов: уменьшении размера пластид, увеличении пластоглобул, нарушении организации ламеллярных образований [4]. Кроме того, трансгенные линии томата были более толерантными к воздействию ультрафиолетового излучения по сравнению с контрольными растениями [5]. Поскольку фотосинтетические органеллы являются особенно чувствительными к действию солей, трансгенные растения подвергали солевому

стрессу, индуцированному  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ультраструктура пластид контрольных растений при этом, как и ожидалось, оказалась сильно повреждена, нарушена форма пластид, целостность внешней мембраны, отмечены отличия в структуре ядерного компартамента. В то же время, хлоропласты трансгенных растений имели развитую систему тилакоидов гран и стромы, что свидетельствовало об устойчивости линий [2].

Цель нашей работы — изучить эффект солевого стресса, вызванного действием  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , на параметры клеточного цикла в меристематических клетках корня трансгенных и контрольных растений томата и подтвердить тот факт, что трансформация растений геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы способна формировать защиту не только компартаментам, ответственным за фотосинтетические реакции, но и другим метаболическим процессам, протекающим в корне и сказывающимся на критических точках клеточного цикла и пролиферативной активности генетически измененных клеток.

### Методика

*Имитация засоления in vitro.* Ранее нами были получены несколько линий томата, экспрессирующего интродуцированный ген Fe-зависимой супероксиддисмутазы гороха. Две линии, отличающиеся увеличенной активностью супероксиддисмутазы и различающиеся по активности нейтрализующей ее продукт ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) аскорбатпероксидазы, были выбраны для дальнейших исследований. Для испытания эффективности защиты Fe-SOD1-трансгенных линий (№ 8 и № 6) томата растения клонировали. После того, как для них был подтвержден трансгенный статус [4], растения томата переносили с агаризованной среды MS в пробирки с жидкой питательной средой  $\text{V}_2$  MS, чтобы минимизировать реакцию растений на механические повреждения при взятии проб. Для того чтобы растения «не тонули», использовали стерильные поддерживающие лесенки из двух слоев фильтровальной бумаги. После адаптации растений томата к новым условиям и образования у них новых корней (примерно через 2 нед.) растения помещали в растворы, содержащие  $\text{NaCl}$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Выровненные по осмотическому давлению до 400 кПа, что соответствует 97,4 и 77,5 мМ. Эти концентрации были выбраны в предварительном эксперименте как соответствовавшие порогу, установленному для обратимого ингибирования прорастания семян томата. В растворе также присутствовал антибиотик клафоран 500 мг/л. В эксперименте использовали по три повторности каждой линии — как для контроля ( $1/2$  MS), так и для сред с добавлением  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

*Цитофотометрия.* Для проведения цитофотометрического анализа кончики корня (0,5–0,7 см) трансгенных и контрольных растений фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (в соотношении 3:1) в течение 3 ч. Зону корневой меристемы (до 1–2 мм) отделяли и помещали на 2 ч при 37°C в мацерующую смесь, содержащую 0,4% целлюлазы («Sigma», США) и 0,4% пектиназы («Мегк»), затем окрашивали по методу Фельгена (реактив Шиффа, «Мегк») в течение 2 ч (время гидролиза в 5N HCl при 22°C 40 мин) и готовили постоянные препараты. Для определения содержания ДНК ядра меристематических клеток измеряли на цитофотометре SMP-20 (Opton) с объективом x16, окуляром x10 и зондом 0,16 мм. В качестве стандарта использовали ядра меристематических клеток корня в стадиях телофазы (2C) или метафазы (4C). Выборка для каждой экспериментальной точки составляла не менее 300 ядер из клеток 10 корешков. Данные анализировали в программе «Статистика 5,0», для визуализации использовали гистограммы, построенные в программе Excel.

## Результаты и их обсуждение

Основной характеристикой пролиферативной активности клеток является митотический индекс. В контрольных растениях томата этот показатель составляет около 5,7% (рис. 1).

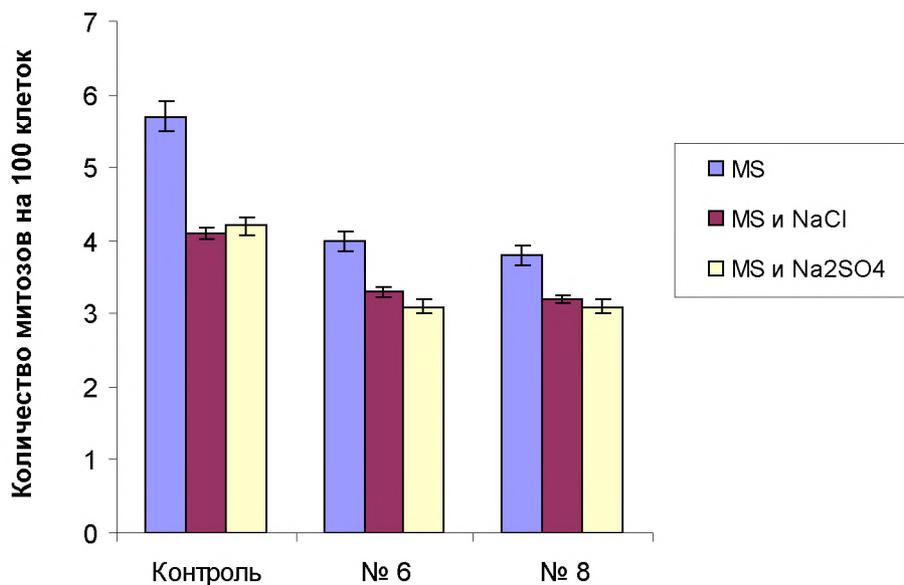


Рис. 1. Митотический индекс регенерантов томата под действием NaCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

После проращивания таких томатов в условиях сульфатного засоления среды наблюдается уменьшение митотического индекса на 26% в клетках корневой меристемы, а у трансгенных линий томата — на 18-22% (№ 8 и № 6). При хлоридном засолении МИ у контрольных томатов снижается на 28%, а у транс генных — на 15-20%.

Нарушения клеточного цикла характерны для многих стрессовых воздействий и являются реакцией растительных клеток на засоление, обезвоживание и температурные стрессы, однако, как показали исследования, различные стрессовые воздействия имеют свои особенности. Изучение клеточного цикла корневой меристемы томата показало, что хлорид и сульфат натрия по-разному влияют на распределение клеток по периодам интерфазы и митоза.

Цитофотометрическим методом показано, что изменение митотической активности сопровождалось соответствующим изменением продолжительности фаз клеточного цикла. Цитофотометрическое определение динамики прохождения клеток по циклу показало, что под действием хлорида и сульфата натрия в клетках меристемы корня трансгенных растений томата (линии № 6 и № 8) увеличивается продолжительность пресинтетической фазы клеточного цикла. Это можно объяснить неблагоприятными для него условиями культивирования. Так, при хлоридном засолении количество клеток в G1-фазе увеличивается у контрольных растений томата вдвое, а у трансгенных (линии № 6 и № 8) — на 33%, в S-фазе число клеток уменьшилось:

у контрольных томатов — в 2,6 раза, у линии № 8 — на 35%. У линии № 6 произошло увеличение клеток в синтетической фазе на 25%.

В меристематических клетках трансгенной линии № 8 при хлоридном и сульфатном засолении происходит блокирование перехода G1/S и как следствие ингибирование процесса репликации ДНК. В вариантах с трансгенной линией № 6 наблюдается увеличение количества клеток в G1-фазе до 40% и снижение их в G2-фазе на 25%. Это означает, что засоление является цитостатическим фактором, частично блокирующим нормальное деление клеток. Такая остановка деления отмечалась в работах американских авторов [6, 18].

Таким образом, действие хлорида и сульфата натрия приводит к перераспределению интерфазных клеток корневой меристемы по фазам клеточного цикла как у контрольных, так и у трансгенных растений томата. Однако у трансгенных растений наблюдаются свои особенности. Среди них более умеренное увеличение количества клеток в пресинтетической фазе у трансгенного томата (линии № 6 и № 8) по сравнению с контролем (рис. 2), создание блока G1/S у трансгенного томата (№ 8, рис. 2), в отличие от контрольного (рис. 2), а также снижение количества клеток в G2-фазе (рис. 2). В целом трансгенные растения оказались более толерантными к хлоридному и сульфатному засолению по сравнению с нетрансгенными. Более медленное снижение пролиферации и задержка клеток в фазе G1 свидетельствуют о большей толерантности трансгенных растений к данным неблагоприятным условиям выращивания.

Пролонгированное действие хлорида и сульфата натрия показало, что по таким параметрам, как МИ и распределение клеток по фазам клеточного цикла, томат линии № 8 обладает большей устойчивостью к засолению по сравнению с томатом линии № 6.

Трансгенные растения лучше переносят засоление хлоридом и сульфатом натрия по сравнению с нетрансгенными. Полученные данные являются основой для разработки прогностического метода, позволяющего оценить солетолерантность трансгенных растений на ранних этапах их развития.

Нетрансгенные растения томата реагировали на  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и еще более на  $\text{NaCl}$  увеличением пула клеток в G1-фазе, при этом наблюдалось снижение числа клеток в S-фазе, также более заметное при действии  $\text{NaCl}$ , несколько снижено количество клеток в G2-фазе. Это свидетельствует о сильном эффекте данных солей на клеточный цикл, вероятно, в силу чувствительности цитоскелета и сильной вакуолизации клеток, характерной для  $\text{NaCl}$  — это воздействие более значительно влияет на рост. Относительная стабильность S-фазы и значительное увеличение клеток в G1 может свидетельствовать о своеобразном покое, который способствует выживанию в условиях стресса на фоне сохранения относительно стабильной пролиферации у некоторой части клеток. При этом можно предположить, что несколько избыточное количество клеток в S-фазе в контроле может быть вызвано наличием анаэробноза, естественного для подобной постановки эксперимента.

Трансгенные растения томата линий № 6 и № 8 с геном FeSOD1 демонстрировали разные реакции на воздействие солей. При этом можно считать, что растение томата линии № 8 оказалось более устойчивым к обеим солям, в то же время сохраняя чувствительность к их воздействиям. При этом происходило увеличение числа клеток в G1-фазе, сохранение числа клеток в синтетической фазе и уменьшение их числа в G2-фазе. Не наблюдалось ареста делений клеток томата, что свидетельствует в пользу отсутствия повреждений у цитоскелета всего томатного растения. Линия

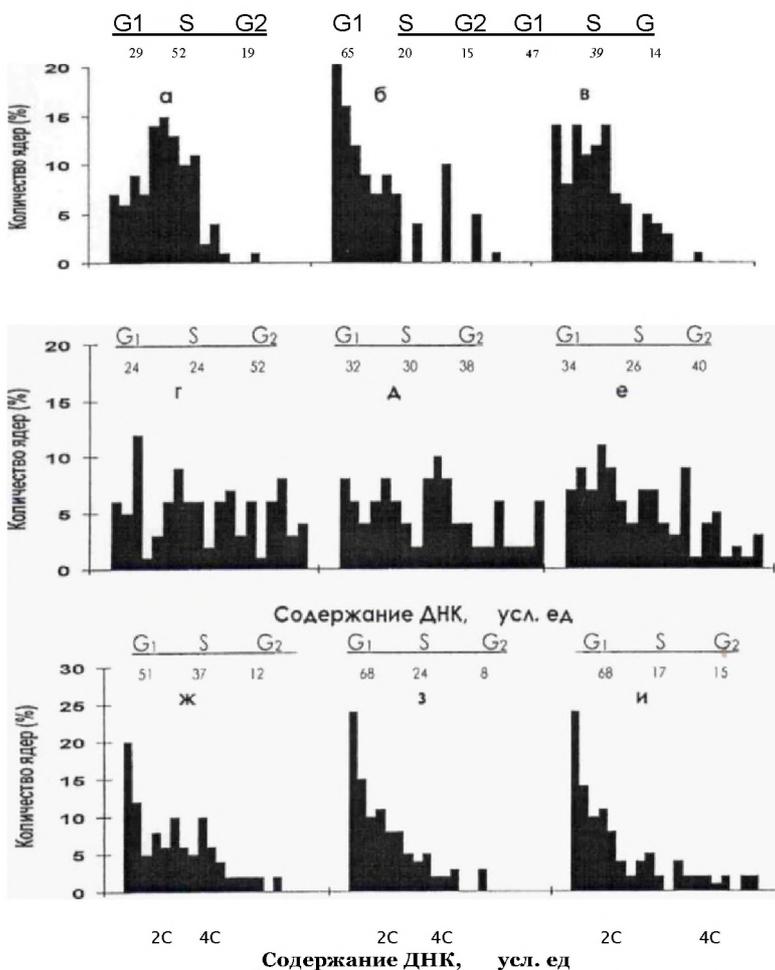


Рис. 2. Распределение клеток корневой меристемы контрольного томата (а — контроль, б — хлорид натрия, в — сульфат натрия) и трансгенных (г, д, е — № 6, ж, з, и — №8; г, ж — контроль, д, з — хлорид натрия, е, и — сульфат натрия) по фазам клеточного цикла

№ 8, вероятно, имела значительную чувствительность уже к условиям анаэробно-за, так как демонстрировала значительное число клеток в G1-фазе, что предполагает замедление вступления клеток в синтетическую стадию цикла, т.е. наступление своеобразного покоя. Можно предположить, что это вызвано препятствиями к разборке веретена деления либо другими процессами, но данная тенденция сохраняется у этого растения и при действии сульфата натрия, некоторое снижение наблюдается лишь в присутствии хлорида натрия (NaCl), который вызывает сильное снижение количества клеток, находящихся в синтетической фазе, что может быть последствием замедления выхода из фазы митоза и, частично, с блокированием вступления в эту фазу.

## Заключение

Обе линии трансгенных растений томата демонстрируют отличия в митотическом индексе и клеточном цикле по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о том, что введение данного гена может приводить к неоднозначной реакции растений томата на стресс и в ряде случаев будет способствовать как увеличению их устойчивости к нему, так и может препятствовать нормальному росту, что связано с изменениями нормального течения клеточного цикла. Эти данные свидетельствуют о необходимости индивидуального тестирования каждого трансгена томата. Такие различия в клеточном цикле растений линий № 6 и № 8 также можно объяснить различиями в размещении трансгенной вставки в геноме томата, что потребует от нас дальнейших исследований.

### Библиографический список

1. Баранова Е.Н., Гулевич А. А. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода к устойчивости растений к засолению // Сельскохозяйственная биология. 2006. № 1. С. 36-59.
2. Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В. Ультраструктурная организация клеток трансгенного томата с геном FE-SOD под действием засоления // Известия ТСХА. 2011. № 1. С. 90-96.
3. Луценко Э.К., Марушко Е.А., Кононенко Н.В., Леонова Т.Г. Влияние фузикококцина на ранние этапы роста сорго при высоких концентрациях NaCl. // Физиология растений. 2005. Т. 52. №3. С. 378-383.
4. Serenko E.K., Baranova E.N., Balakhnina T.I., Kurenina L. V, Gulevich A.A., Kosobruhov A.A., Maisurvan A.N., Polyakov VY. Structural organization of chloroplast of tomato plants *Solanum lycopersicum* transformed by Fe-containing superoxide dismutase // Biochemistry (Moscow) Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology. 2011. Vol. 5. № 2. P. 177-184.
5. Baranova E.K., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L. V, Gulevich A.A., Maisurvan 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. Vol. 36. № 4. P. 242-249.
6. Bursens S., Himanen K., van de Cotte B., Beeckman T., Van Montagu M., Inze' D., Verbruggen N. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2000. Vol. 211. P. 632-640.
7. Granier C., Inze I., Tardieu F. Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions // Plant Physiol. 2000. Vol. 124. P. 1393-1402.
8. Gusta L.V, Benning N.T., Wu G., Luo X., Liu X., Gusta M.L., McHughen A. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // Molecular Breeding. 2009. Vol. 24. P. 103-115.
9. Inze I., Van Montagu M. Oxidative stress in plants // Curr. Opin. Biotech. 1995. Vol. 6. P. 153-158.
10. Jang S.J., Shin S.H., Yee S.T., Hwang B., Im K.H., Park K.Y. Effects of abiotic stresses on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells // Molecules and Cells. 2005. Vol. 20. P. 136-141.
11. Lin Wang Y, Wang G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status // Journal of Plant Physiology. 2006. Vol. 163. P. 731-739.
12. Mancini A., Buschini A., Maria Restivo F.M, Rossi C., Poli P. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants // Plant Science. 2006. Vol. 170. P. 845-852.
13. Reichheld J.-P., Vernoux T., Lardon F., Van Montagu M., Inze D. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress // Plant Journal. 1999. Vol. 17. P. 647-656.

14. Schuppler U., He P.-H., John P.C.L., Munns R. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves // Plant Physiol. 1998. Vol. 117. P. 667-678.

15. Tabur S., Demir K. Effects of Triacntanol Pretreatment on Mitotic Index and Chromosome Abnormalities under Salt Stress Biyoloji Bilimleri Arastinna Dergisi // BIBAD. 2008. Vol. 1 (1). P. 11-15.

16. Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J.M., Moens T., Botterman J., Van Montagu M., Inze D. Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize // Plant Cell Physiol. 1999. Vol. 40. P. 515-523.

17. Wang F.-Z., Wang O.-B., Kwon S.-Y., Kwak S.-S., Su W.-A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase // J. of Plant Physiology. 2005. Vol. 162. P. 465-472.

18. West G., Inze I., Beemster G. T. S. Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress // Plant Physiol. 2004. Vol. 135. P. 1050-1058.

## EFFECT OF SODIUM CHLORIDE AND SODIUM SULFATE ON CELL CYCLE OF TRANSGENIC TOMATO ROOT MERISTEM

N.V. KONONENKO<sup>2</sup>, E.N. BARANOVA<sup>1-2</sup>, A.A. GULEVICH<sup>2</sup>, E.K. SERENKO<sup>2</sup>,  
L.V. KURENINA<sup>2</sup>, N.V. LAVROVA<sup>1</sup>, M.A. LRAKHOLISOVA<sup>1</sup>

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev,

<sup>2</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology of RAAS)

*DNA content in meristematic root cells of Fe-SOD-transgenic and non-transgenic tomato plants (Solanum lycopersicum) under the influence of sodium chloride and sodium sulfate was detected cytophotometrically. It was found that salts both in the transgenic lines and in the control tomato plants resulted in growing number of nuclei in G1 phase of cell cycle and their reduced number in S phase. However, the quantity of cells in G1 phase under application of sodium chloride was increased twice in control tomato plants, whereas by 33% in transgenic plants compared to the variants without salt application. It was shown that the rate of proliferation during stress is reduced (by 18-22%) in transgenic lines and by 26% in the control tomato plants.*

*Keywords: salt stress, transgenic tomato plants, superoxide dismutase, cell cycle.*

**Кононенко Неонила Васильевна** — к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ВНИИСХБ РАСХН. Тел.: (499) 977-16-36.

**Баранова Екатерина Николаевна** — к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ВНИИСХБ РАСХН. Тел.: (499) 977-16-36.

**Гулевич Александр Анатольевич** — ст. науч. сотр. лаборатории клеточной инженерии ВНИИСХБ РАСХН. Тел.: (499) 977-31-41.

**Серенко Екатерина Константиновна** — асп. лаборатории клеточной инженерии ВНИИСХБ РАСХН. Тел.: (499) 977-31-41.

**Куренина Людмила Владимировна** — к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной инженерии ВНИИСХБ РАСХН. Тел.: (499) 977-31-41.

**Лаврова Наталия Владимировна** — д. б. н., проф. кафедры технологии хранения и переработки плодов и овощей РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 977-10-33.

**Трахолисова Мария Андреевна** — асп. кафедры технологии хранения и переработки плодов и овощей РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 977-10-33.