

УДК 577.21+602.6

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОК  
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ГЕНОМ Fe-SOD  
ПРИ ЗАСОЛЕНИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Е.Н. БАРАНОВА<sup>1</sup>, А.А. ГУЛЕВИЧ<sup>2</sup>, А.Н. МАЙСУРЯН<sup>2</sup>, Н.В. ЛАВРОВА<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Кафедра хранения и переработки продукции растениеводства  
РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева; <sup>2</sup> Всероссийский  
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии)

**Проведено сравнительное ультраструктурное исследование независимых трансформантов томата, трансгенных по гену Fe-SOD. Отмечены существенные различия в развитости и сохранности ультраструктуры клеток мезофилла: хлоропластов, ядер, ядрышек между трансгенными и нетрансгенными растениями томата при действии солевого стресса, свидетельствующие об увеличении устойчивости в результате трансгеноза.**

*Ключевые слова:* засоление питательной среды, трансгенные растения, in vitro.

Засоление является главным сдерживающим фактором предельной производительности сельского хозяйства на 20% посевной площади и половины орошаемых земель во всем мире [14]. Избыточная соленость является причиной торможения роста и развития, угнетения процессов фотосинтеза, дыхания и синтеза белков у культурных растений, которые чувствительны к почвенному засолению [8, 11]. Одним из важных последствий солевого стресса у растений является чрезмерная генерация активных форм кислорода, таких как супероксид анион ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксильных радикалов ( $OH^{\cdot}$ ), в частности в хлоропластах и митохондриях [10]. Все эти активные виды кислорода повреждают различные внутренние структуры клетки и вступают в биохимические реакции [6, 7]. В растительной клетке

нейтрализация ROS осуществляется рядом ферментов: пероксидазой, супероксиддисмутазой, аскорбатпероксидазой, глутатионредуктазой и др. Антиокислительную активность внутри клетки можно значительно повысить, внедрив в геном реципиентного растения ген фермента супероксиддисмутазы [1, 13], под контролем промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии во всех органах и тканях.

Для внедрения этого гена в растения томата мы использовали метод генетической трансформации посредством *Agrobacterium tumefaciens*, которая содержала экспрессионный вектор, придающий устойчивость к повреждающему действию окисления (ген Fe-содержащей супероксиддисмутазы из *Arabidopsis thaliana*) [4]. Ранее было показано, что и фотосинтезирующие (хлоропласты) и нефото-

синтезирующие (амило- и этиопласты) пластиды чувствительны к солевому и осмотическому воздействию, что сказывается на их ультраструктурной организации у люцерны [2], томата [3] и табака [12]. Для защиты процессов фотосинтеза, осуществляющихся в хлоропластах, данный ген обладал сигнальной последовательностью, направляющей белок в хлоропласт. В экспрессионной конструкции ген Fe-SOD находился под контролем конститутивного промотора CaMV 35S и терминатора NOS. В задаче нашей работы входило изучение защитных эффектов внедрения гена Fe-зависимой супероксиддисмутазы в растения томата, подвергнутые солевому стрессу. Мы изучали ультраструктурную организацию пластид и общую сохранность цитоплазматических структур и ядер.

### Методика

Для оценки эффективности защиты, индуцированной Fe-SOD, растения подвергали солевому стрессу посредством воздействия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в концентрации, которая сильно ингибировала развитие проростков у нетрансгенных растений.

Использовали трансгенные растения томата *Solarium lycopersicum* (*Lycopersicon esculentum*) сорта Белый налив, полученные нами ранее [1]. Для испытания отобранных трансгенных растений клоны помещали в пробирки с жидкой средой MS и полоской фильтровальной бумаги (для фиксации эксплантов) и выращивали в течение 2 нед., после чего растения помещали в пробирки со средой MS, содержащей 77,5 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . При этой концентрации в предварительном эксперименте происходило сильное ингибирование прорастания семян. Для цитологических исследований трансформантов с Fe-SOD трансгенные и нетрансгенные растения томата, предварительно помещенные в условия жидкой среды MS, перенесли в

условия жидкой среды MS с 77,5 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (концентрация, ингибирующая развитие проростков).

На 5-е сутки для электронной микроскопии фрагменты корней и листьев (1-2 мм) фиксировали в течение 4 ч при 22°C в 2%-м растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере с добавлением сахарозы (15 мг/мл, pH 7,2), постфиксацию в 1%-м  $\text{OsO}_4$  на 0,1 М фосфатном буфере проводили в течение 2 ч, дегидратацию и заключение материала в смолу — по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали и просматривали на TEM H-300 (Хитачи, Япония).

### Результаты и их обсуждение

Получено 15 зеленых растений томата, устойчивых к канамицину. По данным ПЦР-анализа, в результате трансформации у 9 растений, прошедших селекцию на канамицине, произошла интеграция гена в геном растений [1]. При стрессе ультраструктура клеток корневого чехлика, меристемы и зоны растяжения значительно различалась у трансгенных и нетрансгенных растений. Если в нормальных условиях существенных различий между контрольным растением (рис. 1 А, Б) и растением с Fe-SOD не наблюдали, то в присутствии  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  у трансгенного растения сохранялась неповрежденная ультраструктура клеток меристемы (рис. 1 Д, Е). Так, при воздействии они сохраняли ненарушенную ультраструктурную организацию цитоплазмы, митохондрий, пластид, аппарата Гольджи и ядерного компартмента во всех типах ткани (чехлике, меристеме, паренхиме зоны растяжения). Некоторые наблюдаемые изменения не обладали повреждающим характером и относились к формированию центральной вакуоли, ультраструктуры ядер и ядрышек, появлению сопоставимого по размеру с крахмальным зерном пластидного включения осмиофильного характера, предположительно

липидной природы (см. рис 1 Д, Е). В клетках зоны чехлика и зоны растяжения можно выделить некоторые отличия от контроля и клеток меристематической зоны, свидетельствующие о большей их чувствительно-

сти к повреждающему воздействию, однако сохранялась типичная целостность мембран и ультраструктура. Нетрансгенные растения, подвергшиеся стрессу, имели сильные повреждения необратимого характера (рис. 1 В, Г).

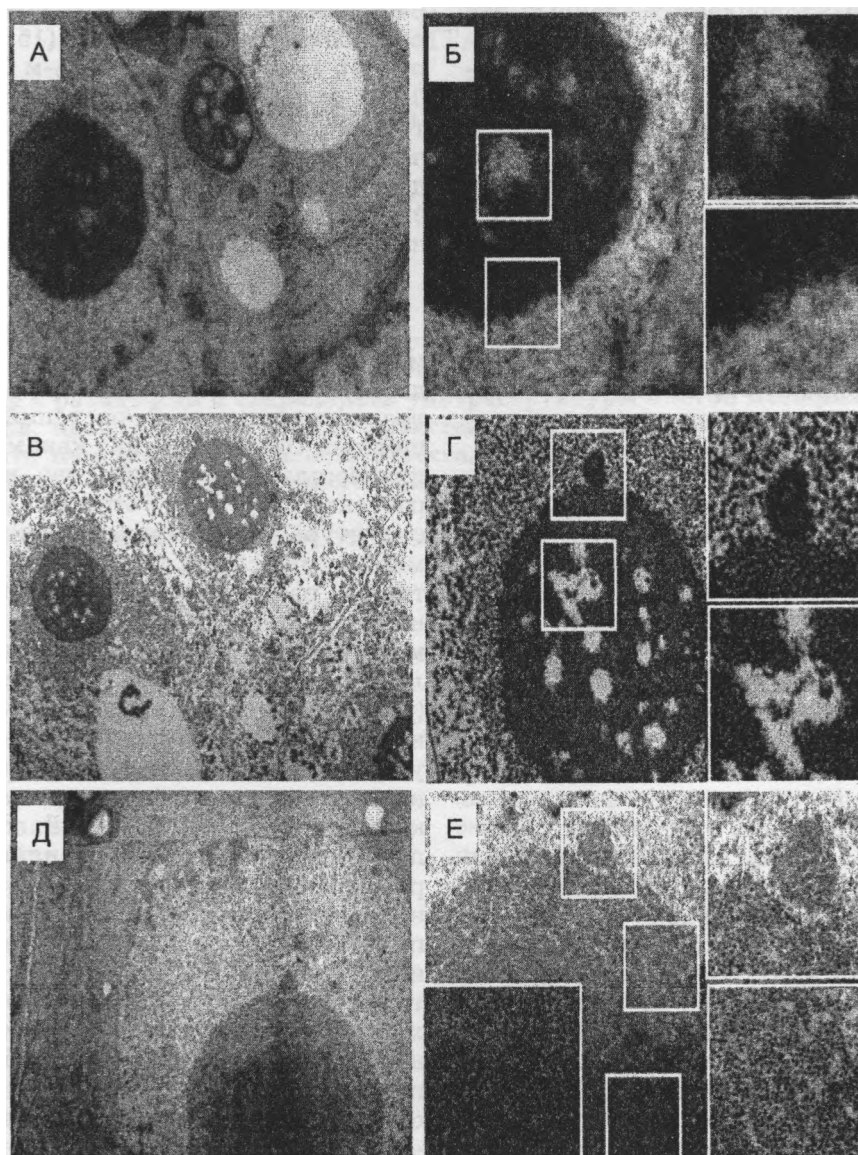


Рис. 1. Ультраструктура клеток меристемы корня томата. Нетрансгенные растения (А, Б, В, Г), трансгенные растения с FeSOD (Д, Е), контроль MS (А, Б), после действия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (В, Г, Д, Е)

У нетрансгенных растений в этих тканях происходили необратимые нарушения целостности мембран, дегградация митохондрий, пластид и ядер.

Ультраструктура ядер в листьях контрольных и трансгенных растений при воздействии  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  также значительно различалась. В отличие от повреждений, отмеченных в корне, нуклеоплазма ядер нетрансгенных растений приобрела по сравнению с контролем (рис. 2 А) более плотную структуру, также значительно (в 2 раза и более) увеличивался размер ядрышек и количество расположенного по периферии гранулярного материала (рис. 2 В). Ядра трансгенных растений имели более светлую нуклеоплазму, близкие к норме размеры ядрышка, однако структура периферического примембранного хроматина соответствовала структуре глыбок в контрольном растении при действии стресса. Подобные изменения могут свидетельствовать о том, что синтез рРНК, который в норме индуцируется стрессом и, возможно, связан с ролью активных форм кислорода в передаче сигнала у трансгенных растений в листьях, при данном воздействии не индуцируется. Вероятно, это связано с недостаточной интенсивностью сигнала либо с уменьшением повреждения, так как листья подвергаются негативному действию лишь опосредованно. Присутствие глыбок периферического хроматина, аналогичных тем, которые можно наблюдать в контрольном растении при стрессе, свидетельствует о наличии ответа, однако не позволяет судить о его специфичности или неспецифичности, а лишь дает возможность предполагать изменения в синтезе или процессинге некоторой части мРНК. Этот результат особенно интересен тем, что может объяснить отсутствие усиления солетолерантности у трансгенных растений, отмеченное в ряде работ. Следует отметить, что структура ядер у двух трансгенных

растений, как и при исследовании их корней, имела некоторые отличия от нетрансгенных, в частности, в плотности нуклеоплазмы. Другим важным результатом является изменение структурной организации пластид у трансгенных и нетрансгенных растений (рис 2 Б, Г, Е, 3). Интересно отметить несколько важных эффектов. У нетрансгенных растений в ответ на воздействие  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  наблюдалось увеличение количества крахмальных зерен, разрушение целостности мембран, образование пузырьков на поверхности с последующим образованием внутренних двойных мембран и отпочковыванием округлых пузырьков (темные стрелки), уменьшение количества пластоглобул (см. рис. 2 В). Также интересно увеличение количества характерных для многих растений семейства *Solanaceae* образований, идентифицируемых как пероксисомы, с внутренними кристаллическими структурами (светлые стрелки, рис. 2 В). Следует отметить, что различия в ультраструктуре пластид между двумя трансгенными растениями очень значительны. Кроме того, наблюдаются различия в количестве крахмальных зерен и уровне развитости тилакоидной системы, однако общим является сохранение пластоглобул (см. рис 2 Е, 3), которые имеют меньшие размеры, чем в контроле (см. рис. 2 Б). Интересно показанное на рисунке 2 3 соединение хлоропласта с содержащей кристалл структурой через специализированный, состоящий из нескольких изогнутых ламеллярных структур, мостик. Хотя данная картина является уникальной, в пластидах этого образца на одном из концов часто можно было наблюдать подобные ламеллярные образования.

Анализ нескольких трансгенных растений показал, что структура их ядер, ядрышек и пластид несколько различалась под действием стресса. Мы предполагаем, что это может быть связано с особенностями экс-

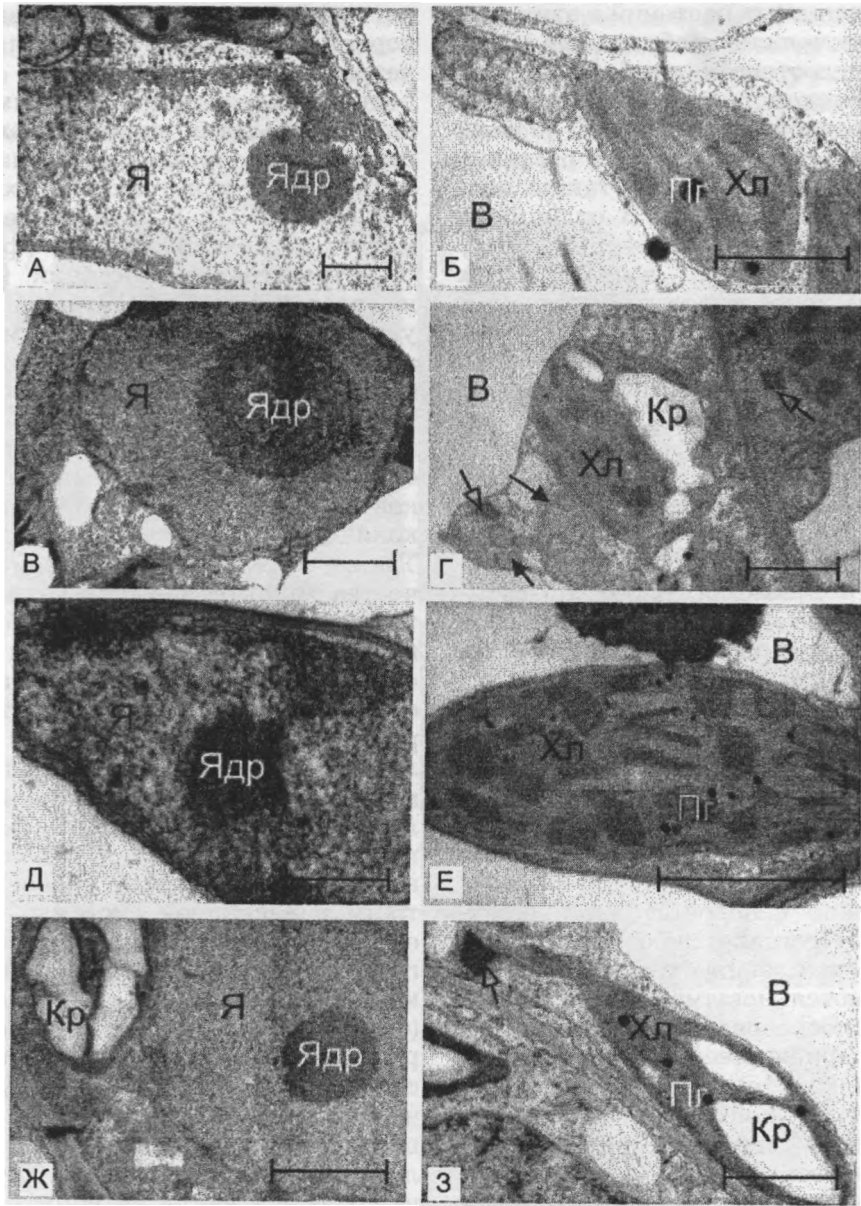


Рис. 2. Ультраструктура клеток листа томата. Нетрансгенные растения (А, Б, В, Г), трансгенные растения с FeSOD 1 (Д, Г), 2(Ж, 3), контроль MS (А, Б), после действия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (В, Г, Д, Е, Ж, 3)

прессии или интеграции гена. Влияние засоления на структуру листа томатов, выразившееся в изменении структуры листа, было продемонст-

рировано в работах Строгонова и др. [5], однако сложности в методическом исполнении и ранее и сейчас часто приводят к публикации разного

рода артефактов, свидетельствующих о необратимых изменениях пластид и митохондрий, но в некоторых работах все же приводятся данные о влиянии засоления на размер, форму, количество крахмальных зерен, пластоглобул в пластидах [12]. В ряде исследований повторяются данные Строгонова, демонстрируются процессы деградации в тканях мезофилла, вызванные непосредственным влиянием соли (NaCl) на ткани листа, сформированные в ее отсутствие, т.е. неспособность адаптироваться к новым условиям посредством перестройки тканей сосудистого пучка [9]. В нашей работе растения подвергались 7-дневному стрессу, вызывавшему у нетрансгенных растений такие же необратимые изменения, трансгенные

же растения выдержали испытания и сохранили ультраструктуру клеток неповрежденной.

### Заключение

Впервые удалось идентифицировать и охарактеризовать на уровне изменения ультраструктуры клеток защитную функцию растения, появившуюся в результате переноса гена. Выявлена перспективность данного гена для защиты растений, по крайней мере, от воздействия солевого стресса определенной интенсивности. Дальнейшие испытания позволяют получить информацию об эффективности ее использования против других абиотических стрессов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (07-08-00610-а).

### Библиографический список

1. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология, 2006. Т. 48., №6. С. 465-474.
2. Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Поляков В.Ю. Эффекты NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и маннита на утилизацию запасного крахмала и формирование пластид в семядолях и корнях проростков люцерны // Физиология растений, 2007. Т. 54. № 1. С. 59-67.
3. Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Лаврова Н.В. Цитоплазматическая характеристика устойчивости мобилизации запасных веществ при прорастании семян томата в условиях засоления среды // Известия ТСХА, 2009. Вып. 3. С. 61-64.
4. Серенко Е.К., Овчинникова В.Н., Гулевич А.А., Куренина Л.В., Майсурян А.Н., Баранова Е.Н., Харченко П.Н. Получение трансгенных растений томата *Solanum lycopersicum* с геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы // Доклады РАСХН, 2009, № 4. С. 12-14.
5. Строгонов Б.П., Кабанов В.В., Шевякова Л.П., и др. Структура и функции клеток растений при засолении, 1970. М.: Наука.
6. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2000. Vol. 51. P. 463-499.
7. Inze D., Van Montagu M. Oxidative stress in plants // Curr. Opin. Biotech. 1995. Vol. 6. P. 153-158.
8. Meloni D.A., Oliva V.F., Martines C.A., Cambraia J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress // Environ. Exp. Bot., 2003. Vol. 49. P. 69-76.
9. Miyake H., Mitsuya S., Rahman M.S. Ultrastructural effects of salinity stress in higher plants // Abiotic stress tolerance in plants, 2006. P. 215-226.
10. Mittler R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci., 2002. Vol. 7. P. 405-410.
11. Pal M., Singh D.K., Rao L.S., Singh K.P. Photosynthetic characteristics and activity of antioxidant enzymes in salinity tolerant and sensitive rice cultivars // Physiol. Plant., 2004., Vol. 87. P. 227-231.

12. Sam O., Ramirez C., Coronado M.J., Testillano P.S., Risueno M.C. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure // *Biol. Plant.*, 2003. Vol. 47. P. 361-366.

13. Van Camp W., Bowler C., Villaroel R., Tsang E.W., Van Montagu M., Inze D. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990. Vol. 88. P. 9903-9907.

14. Zhu J.K. Plant salt tolerance // *Trends Plant Sci.*, 2001. Vol. 6. P. 66-77.

*Рецензент* — д. б. н. Л.Н. Хрусталева

#### SUMMARY

Comparative ultra-structural research into independent tomato transformants, transgenic by Fe-SOD gene, has been done. Considerable differences, indicative of a rise in stability, resulted from transgenesis, expressed by both maturity and integrity of mesophyll cells' ultra-structure: chloroplasts, nuclei, nucleoluses between both transgenic and non-transgenic tomato plants under the influence of saline stress, have been registered in the article.

*Key words:* salinization of nutrient medium, transgenic plants, in vitro.

**Баранова Екатерина Николаевна** — к. б. н. Эл. почта: [greenpro2007@rambler.ru](mailto:greenpro2007@rambler.ru)

**Гулевич Александр Анатольевич** — асп. каф. хранения и переработки продукции растениеводства РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева.

**Майсурян Александр Николаевич** — д. б. н.

**Лаврова Наталия Владимировна** — д. б. н. Тел. (499) 977-10-33.