

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ИСХОДНОЙ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА *IN VITRO* НА ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

А.С. Лукаткин¹, Т.А. Лукшина¹, О.А. Ведяшкина¹, Л.В. Куренина², А.А. Гулевич², Е.Н. Баранова²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», Саранск, Россия, aslukatkin@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва Россия, greenpro2007@rambler.ru

Аннотация. На трех линиях табака (*Nicotiana tabacum* L.) – исходной (Wt, сорт Самсун) и двух трансформированных, выращиваемых в культуре *in vitro*, изучали реакцию на кратковременное действие пониженных (5 °С) и повышенных (40 °С) температур. Более сильные нарушения структуры и функционирования мембран и фотосинтетического аппарата выявлены после температуры 40 °С. Самыми чувствительными к температурным воздействиям оказались растения-регенеранты Wt, а устойчивыми – трансформанты по гену Fe-СОД.

Ключевые слова: табак, трансформанты, температурный стресс, состояние мембран, флуоресценция хлорофилла

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-484-487

Создание трансгенных растений является одним из основных направлений интенсификации мирового сельского хозяйства. Это эффективный и перспективный путь, позволяющий направленно изменять как генотип, так и фенотип сельскохозяйственных растений [Кулуев и др., 2016]. При этом можно использовать различные способы генетической трансформации в зависимости от целей и задач данной конструкции. В связи с интенсивным развитием биоинформационных технологий в настоящее время известно много целевых генов, модификация которых позволит повысить продуктивность и устойчивость культурных растений. Наряду с прикладными задачами, трансгенные растения являются удобными модельными объектами при изучении реакции на различные абиотические стрессы, поскольку позволяют вычленять отдельные звенья метаболизма, где эффективно изменено функционирование, и оценить роль этих изменений при действии неблагоприятных факторов.

Одним из ключевых факторов в формировании высокой продуктивности сельскохозяйственных растений является их устойчивость к абиотическим и биотическим стрессорным факторам. Среди абиотических факторов ведущую роль играет температура. Неблагоприятные температуры снижают урожай культурных растений на 50% и более, вызывают повреждения структуры, нарушения физиологических и биохимических процессов в растениях [Лукаткин, 2002]. Поэтому исследование температурной устойчивости создаваемых сортов и селекционных образцов культурных растений необходимо на каждом этапе селекционного процесса.

Для исследования функций определенных генов используют различные модельные растения, среди которых особое место занимает *Nicotiana tabacum* L.; этот вид относительно легко трансформируется и может быть использован для получения большого количества линий трансгенных растений, которые затем анализируются по многим параметрам, в том числе – на устойчивость к действию неблагоприятных факторов среды.

При оценке влияния абиотических факторов необходимо детальное понимание морфологических, физиологических и биохимических особенностей трансформированных линий (в отличие от исходной линии – Wild type, Wt). В настоящее время известно много линий табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных по различным генам. Так, во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии создано несколько линий, экспрессирующих Fe-СОД из *Arabidopsis thaliana* (преимущественно хлоропластной локализации), и показано, что интродукция гена Fe-СОД повышает стабильность фотосинтетического аппарата при действии окислительного стресса. Трансгенные растения табака имели измененную ультраструктуру клеточных компартментов (хлоропластов), повышенную активность СОД по сравнению с Wt-растениями [Baranova et al., 2010]. В Ягеллонском университете (Краков, Польша) проведена трансформация *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун с использованием штамма LVA 4404 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащего бинарную плазмиду pBI 121, в которую введен ген, кодирующий слитый белок, состоящий из усеченного человеческого пластина и smGFP (пластин-GFP), под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. Посредством такой трансформации стала возможной визуализация актинового цитоскелета, изменяющегося при различных воздействиях [Anielska-Mazur et al., 2009].

Целью данного исследования было сравнительное изучение реакции на температурный стресс Wt-линии табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Самсун) и нескольких трансформированных линий, культивируемых *in vitro*. В работе использовали линию 6214, стабильно экспрессирующую пластин-GFP (семена растений были получены из Малопольского центра биотехнологии, Краков, Польша) и введенную в культуру *in vitro*, а также пробирочные растения линии 29, сверхэкспрессирующие Fe-СОД. Клонально размножаемые растения высаживали на агаризованные среды с минеральной основой по Мурасиге-Скугу и выращивали 30–40 дней в культуре *in vitro* при температуре 20–24 °С и 16-часовом фотопериоде. Регенеранты подвергали 18-часовому воздействию высоких (40 °С) или пониженных (5 °С) температур (контроль выдерживали при 23 °С), сразу после температурного воздействия в листьях определяли состояние клеточных мембран по выходу электролитов (на кондуктометре ОК-102, Radilkis, Венгрия), интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) по накоплению ТБК-реагирующих соединений (на спектрофотометре UVmini1240, Shimadzu, Japan), а также состояние фотосинтетического аппарата (ФСА) по параметрам флуоресценции хлорофилла (ФХ) (на флуориметре Junior PAM, Walz, Germany) [Лукаткин, 2002; Лукаткин, Тютяев, 2017]. Статистическую обработку проводили по стандартным биометрическим методам, с использованием пакетов программ Microsoft Excel.

Морфометрический анализ показал, что растения-регенеранты табака (как Wt, так и трансформанты) проявляли некоторые различия по скорости роста побега. Обычно побегообразование и ризогенез лучше протекали у Wt-линии табака; однако существенной разницы по количеству листьев и узлов между Wt и трансформированными линиями не наблюдалось. Трансформированные линии (6214 и 29) проявляли сходную динамику изменений ростовых параметров и органогенеза при культивировании *in vitro*. Поскольку габитус и морфогенез трансформированных линий не отличался значительно от Wt-растений, их можно использовать при оценке температурной устойчивости растений табака, культивируемых *in vitro*.

Выявлено, что при действии неблагоприятных температур существенно изменялись все измеряемые параметры, указывающие на нарушения структуры и функционирования мембран (показано как по изменениям выхода электролитов из высечек листьев, так и по интенсивности ПОЛ). Более сильные повреждения растений

табака выявлены после воздействия высокой температуры. Сравнение растений-регенерантов табака разных линий показало несколько различающуюся в количественном аспекте реакцию (по индексам повреждения) на неблагоприятные температуры, при этом самыми чувствительными к температурным воздействиям оказались растения, а самыми устойчивыми – трансформанты по гену Fe-SOD. Так, величина коэффициента повреждаемости (КП), рассчитанная на основе выхода электролитов [Лукаткин, 2002], для Wt варьировала от 46 до 54% (для разных температур), тогда как у линии 6214 КП составил 34–36%, а у линии 29 – после воздействия температуры 5 °С лишь 2,5%. Максимальное возрастание интенсивности ПОЛ также было у регенерантов Wt (от 40 до 154% к контролю), в то время как у трансформированных линий (особенно у линии 29) это увеличение было существенно ниже (не превышало 64% для линии 6214 и 15% для линии 29).

Состояние и активность ФСА играют существенную роль при адаптации к неблагоприятным условиям, поэтому определение параметров ФХ считается одним из наиболее быстрых и точных методов оценки реакции растений на воздействие стрессорных факторов. После высоко- и низкотемпературного воздействия в листьях табака наблюдали изменения параметров ФХ, которые указывают на нарушения функционирования фотосистемы II (ФСII). Параметр Fv/Fm (максимальный квантовый выход фотохимии ФСII) в растениях-регенерантах Wt снижался на 18–23%; однако у линий 6214 эти изменения были в пределах 4–16%, а у линии 29 – 10–17%. Параметр, оценивающий фотохимическое использование энергии возбуждения в ФСII – эффективный квантовый выход флуоресценции ФС II, Y(II), снижался в растениях Wt на 21–57%, в линии 6214 – на 11–31%, а в растениях линии 29 – на 10–18%. Сходная тенденция отмечена и для коэффициентов фотохимического тушения флуоресценции qP и qL. В то же время параметры, указывающие на интенсивность нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (qN, NPQ, Y(NO), Y(NPQ)), возрастали при действии неблагоприятных температур, сильнее в вариантах с регенерантами Wt, и слабее – в случае растений линии 29. Это свидетельствует о более высокой стабильности работы ФСА при температурных стрессах у линии табака, трансформированной по гену Fe-SOD.

Таким образом, анализ температурной чувствительности растений-регенерантов нескольких линий табака показал более высокую устойчивость трансформантов, особенно линии 29, относительно дикого типа (Wt). При этом линия, трансформированная по гену Fe-SOD, оказалась более устойчивой к действию пониженной положительной температуры, по сравнению с действием высокой.

Литература

Кулуев Б.Р., Князев А.В., Бережнева З.А., Михайлова Е.В., Постригань Б.Н., Чемерис А.В. Трансгенные растения табака как модельный объект при исследовании продуктивности и стрессоустойчивости // Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность: Сборник статей по материалам VI Всероссийского симпозиума. – М., 2016. – С. 105–108.

Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.

Лукаткин А.С., Тютяев Е.В. Определение состояния фотосинтетического аппарата высших растений при неблагоприятных воздействиях. – Саранск: Изд-во Мордов.ун-та, 2017. – 64 с.

Anielska-Mazur A., Bernas T., Gabrys H. *In vivo* reorganization of the actin cytoskeleton in leaves of *Nicotiana tabacum* L. transformed with plastin-GFP. Correlation with light-activated chloroplast responses // BMC Plant Biology. – 2009. – V.9. – Art. 64. doi:10.1186/1471-2229-9-64

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.

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL REACTIONS TOBACCO OF WILD TYPE AND TRANSFORMED LINES *IN VITRO* AFFECTED BY TEMPERATURE STRESS

A.S. Lukatkin¹, T.A. Lukshina¹, O.A. Vedyashkina¹, L.V. Kurenina², A.A. Gulevich², E.N. Baranova²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Ogarev Mordovia State University», Saransk, Russia, aslukatkin@yandex.ru

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, greenpro2007@rambler.ru

Abstract. Three tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) lines, namely Wt (Samsun cultivar) and two transformed lines, were cultivated *in vitro* and reaction was studied for short-term effects of chilling (5 °C) and heat (40 °C) temperatures. More severe damage to the structure and functioning of membranes and photosynthetic apparatus was detected after a temperature of 40 °C. Regenerated Wt plants were most sensitive to stressful temperatures, but transformed plants with gene of FeSOD were most resistant.

Keywords: tobacco, transformed lines, temperature stress, membrane state, chlorophyll fluorescence