

Биохимия и физиология адаптации к стрессу

УДК 635.21:577.21:574.24:581.19

doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.88rus

ИЗМЕНЕНИЯ В ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ОБРАЗОВАНИИ ФЛАВОНОИДОВ У ИНТАКТНЫХ И ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.) ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Е.В. ПРЯДЕХИНА, П.В. ЛАПШИН, Н.В. ЗАГОСКИНА

Гипотермия сопровождается изменениями в метаболизме клеток, что может приводить даже к их гибели, в связи с чем большое внимание уделяется созданию сортов сельскохозяйственных культур с повышенной устойчивостью к низким температурам. Для подобных целей успешно используются современные методы биотехнологии, в том числе введение генов десатураз, катализирующих превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях жирных кислот в двойные, что может повышать текучесть клеточных мембран и изменять состояние антиоксидантной системы клеток. К числу факторов защиты относятся полифенолы — вторичные метаболиты растений, выполняющие функцию низкомолекулярных антиоксидантов. В настоящей работе изучен эффект кратковременного действия низкой температуры (-9°C в течение 10 и 40 мин) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержание флавоноидов в листьях растений картофеля раннеспелого сорта Скороплодный, культивируемых в условиях *in vitro*, а также полученных из них трансгенных линий со средним (ТЛС) и высоким (ТЛВ) уровнем экспрессии гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы. Для получения трансгенных линий использовали конструкции, несущие ген *desA* из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (трансляционно слит с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу) под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК CaMV. Показано, что после 10-минутного действия низкой температуры интенсивность ПОЛ у контрольных растений снижалась, а у трансформантов не менялась. В варианте, когда растения подвергали гипотермии в течение 40 мин, этот показатель был низким во всех вариантах, причем наименьшим — у ТЛВ. Под влиянием низкой температуры во всех случаях накопление флавоноидов в листьях повышалось, что наиболее ярко проявлялось у контрольного варианта.

Ключевые слова: картофель, *Solanum tuberosum*, десатураза, низкая температура, ПОЛ, флавоноиды.

Снижение температуры окружающей среды — один из стрессовых факторов в период онтогенеза растений. Под его влиянием изменяется метаболизм клеток, что может приводить даже к их гибели (1). В связи с этим большое внимание уделяется изучению устойчивости растений к гипотермии, а также созданию сортов сельскохозяйственных культур с повышенной устойчивостью. Для подобных целей успешно используются современные методы биотехнологии, в частности генно-инженерные подходы, в том числе введение генов десатураз — ферментов, катализирующих превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях жирных кислот в двойные (2). Как следствие, изменяется состояние клеточных мембран (повышается текучесть), возрастает общее содержание жирных кислот и их индекс ненасыщенности, происходят изменения в антиоксидантной системе клеток, что способствует повышению устойчивости растений к низким температурам (3-5).

К числу факторов защиты относятся такие вторичные метаболиты растений, как полифенолы (6). Они способны инактивировать активные формы кислорода, возникающие при стрессовых воздействиях, то есть выполняют функцию низкомолекулярных антиоксидантов (7). О повышении содержания фенольных соединений в растительных тканях в условиях гипотермии сообщалось в литературе (8, 9).

Целью нашей работы было изучение кратковременного действия низкой температуры на перекисное окисление липидов (ПОЛ) и содержа-

ние флавоноидов в листьях растений картофеля, в том числе трансформированных геном Δ 12-ацил-липидной десатуразы (*desA*).

Методика. Объектом исследования были растения картофеля (*Solanum tuberosum L.*) раннеспелого сорта Скороплодный, культивируемые на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, которая содержала 2 % сахарозы. Для получения трансгенных линий использовали конструкции, несущие ген *desA* из *Synechocystis* sp. RCC 6803 (трансляционно слит с последовательностью репортёргенного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу) под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК CaMV (10). Трансгенные линии (ТЛ) имели средний (ТЛС) или высокий (ТЛВ) уровень экспрессии гена *desA* (11). Контролем служили нетрансформированные растения. Условия выращивания — 24 °C, 16-часовой фотoperиод.

Пробирки с 30-суточными растениями (без ватно-марлевых пробок) помещали в климатическую камеру MIR-153 («SANYO Electric Co., Ltd.», Япония) с температурой 0 °C, которую в дальнейшем постепенно снижали до -9 °C (со скоростью 0,3 °C/мин). Растения выдерживали в этих условиях 10 и 40 мин (3).

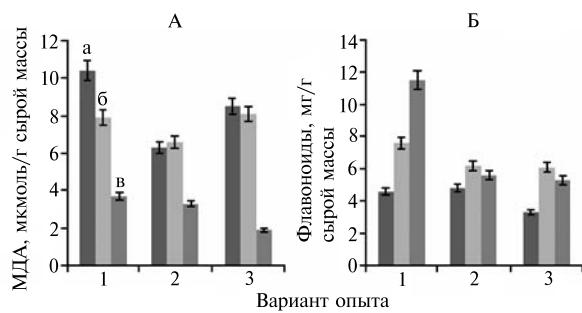
Содержание ТБК-реактивных продуктов, основную долю которых составляет малоновый диальдегид (МДА) — один из конечных стабильных продуктов ПОЛ, — определяли по цветной реакции с тиобарбитуревой кислотой, измеряя оптическую плотность раствора при $\lambda = 532$ нм (12).

Фенольные соединения извлекали из свежих листьев 70 % этанолом (13). Количество флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом с 1 % водным раствором хлористого алюминия (9). Калибровочную кривую строили по рутину.

Эксперименты проводили в 3-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторностях.

Полученные данные обрабатывали с использованием программы Statistica. На рисунке представлены средние значения и их доверительные интервалы.

Результаты. Интенсивность ПОЛ — важный показатель физиологического состояния растений и их ответной реакции на стресс (14). У растений картофеля, выращенных в стандартных условиях (24 °C), наибольшее количество МДА отмечали в контрольном варианте, у ТЛ оно было ниже, особенно у ТЛС (рис., А).



Содержание малонового диальдегида (МДА, А) и флавоноидов (Б) в листьях у растений картофеля (*Solanum tuberosum L.*) сорта Скороплодный, нетрансформированных (1) и трансформированных геном *desA* со средним (2) и высоким (3) уровнем экспрессии: а — 24 °C; б — 10 мин при -9 °C; в — 40 мин при -9 °C (лабораторный опыт).

при -9 °C; в — 40 мин при -9 °C (лабораторный опыт).

риантах, достигая наименьшего значения у ТЛВ. Следовательно, наличие

Известно, что повышение количества МДА в клетках при стрессовом воздействии свидетельствует о деструкции липидных компонентов мембран в результате окислительно-го стресса и более слабой устойчивости растений к гипотермии (14, 15). В нашем случае после 10-минутного действия низкой температуры интенсивность ПОЛ снижалась только в контроле, тогда как после 40-минутного — во всех вар-

гена *desA* и его активность предотвращали развитие стрессовой реакции в листьях у растений картофеля сорта Скороплодный при низкой температуре, что согласуется с данными других исследователей (16).

Основные соединения фенольной природы в листьях картофеля — флавоноиды. На их долю приходится 70-90 % от суммарного содержания полифенолов (10). У контрольных растений и ТЛС, выращиваемых в обычных условиях, содержание этих веществ было практически равным и превышало таковое у ТЛВ (см. рис., Б). При действии низкой температуры во всех случаях накопление флавоноидов в листьях усиливалось, что наиболее ярко проявлялось в контроле и в значительно меньшей степени — у ТЛВ и ТЛС. Следовательно, у растений картофеля, трансформированных геном *desA*, стимуляция накопления флавоноидов в листьях в ответ на стрессовое воздействие была выражена в значительно меньшей степени, чем у нетрансформированных.

Интересен и тот факт, что в условиях низкотемпературного стресса у контрольных растений картофеля отмечалась прямая взаимосвязь между накоплением флавоноидов и интенсивностью ПОЛ в листьях: чем выше было накопление этих вторичных метаболитов, тем менее выраженными были последствия стресса (интенсивность ПОЛ снижалась). Следовательно, проявлялась защитная роль флавоноидов (6, 7). В случае же трансгенных линий такой четкой тенденции не наблюдали.

Таким образом, в листьях растений картофеля (сорт Скороплодный), выращиваемых в условиях *in vitro*, при действии низкой отрицательной температуры происходили значительные изменения в содержании малонового диальдегида и флавоноидов, что не было характерно для растений, трансформированных геном *desA*. В частности, после 10-минутного воздействия низкой температурой интенсивность перекисного окисления липидов у контрольных растений снижалась, а у трансформантов не менялась. В варианте, когда растения подвергали гипотермии в течение 40 мин, этот показатель был низким во всех вариантах, причем наименьшим — у растений с высоким уровнем экспрессии гена *desA*. Это подчеркивает важную роль десатураз в адаптации растений к гипотермии. Под влиянием низкой температуры во всех случаях накопление флавоноидов в листьях повышалось, что наиболее ярко проявлялось у контрольного варианта.

Авторы выражают искреннюю благодарность Н.О. Юрьевой за любезно предоставленные растения картофеля и их трансгенные линии (коллекция Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва).

ФГБУН Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: phenolic@ippras.ru

Поступила в редакцию
19 марта 2014 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 3, pp. 88-91

CHANGES IN LIPID PEROXIDATION AND FLAVONOID CONTENT IN INTACT AND TRANSGENIC POTATO PLANTS (*Solanum tuberosum* L.) AFTER EXPOSURE TO LOW TEMPERATURE

E.V. Pryadekhina, P.V. Lapshin, N.V. Zagorskina

K.A. Timiryazev Research Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35, ul. Botanicheskaya, Moscow,
127276 Russia, e-mail phenolic@ippras.ru
Received March 19, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.88eng

Abstract

Hypothermia leads to metabolic changes that can cause cell death. Thus, breeding varieties

resistant to low temperatures is becoming increasingly important. For this purpose, genetic engineering approach is used to transfer genes of desaturases which catalyze the modification of single C-bonds in fatty acid acyl group to double bonds, resulting in an increase of cell membrane fluidity and changes in the antioxidant system. Polyphenols, the secondary plant metabolites, are considered the protective factors as low molecular weight antioxidants. Here we report the effect of short-term low temperature (-9°C for 10 и 40 min) to lipid peroxidation and flavonoid content in leaves of in vitro cultivated plants of potato (*Solanum tuberosum* L.) early ripening variety Skoroplodnii and its transgenic strains with middle and high expression of $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene. For plant transgenesis, there was used construction of *desA* from *Synechocystis* sp. PCC 6803 conjugated to *licBM3*, encoding thermostable lichenase, a translational reporter, under control of strong constitutive promoter 35S RNA CaMV. It was found that after 10 min exposition to low temperature a peroxidation decreased in reference plants and remained unchanged in the transgenic plants. In case the plants were exposed to hypothermia for 40 min, the peroxidation was low in all variants, being minimal in transgenic plants with high $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene expression. In all variants the flavonoid content in leaves increased when influenced by low temperature with the most pronounced effect observed in the reference variety.

Keywords: potato, *Solanum tuberosum*, desaturase, low temperature, peroxidation of lipids, flavonoids.

REFERENCES

1. Trunova T.I. *Rasteniya i nizkotemperaturnyi stress. 64-e Timiryazevskoe chtenie* [Plants and low temperature stress]. Moscow, 2007.
2. Los D.A. *Fiziologiya rastenii*, 1997, 44: 528-540.
3. Demin I.N., Deryabin A.N., Sin'kevich M.S., Trunova T.I. *Fiziologiya rastenii*, 2008, 55: 710-720.
4. Chi X., Yang Q., Pan L., Chen M., He Y., Yang Z., Yu S. Isolation and characterization of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.*, 2011, 30: 1393-1404.
5. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth. Res.*, 2013, 116(2-3): 489-509.
6. Zaporozhets M.N. *Fenol'nye soedineniya: rasprostranenie, metabolizm i funktsii v rasteniyakh* [Phenols: distribution, metabolism and functions in plants]. Moscow, 1993.
7. Blokhina O., Violainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann. Bot.*, 2003, 91: 179-194.
8. Solecka D., Boudet A.M., Kacperska A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, 1999, 37: 491-496.
9. Zagorskina N.V., Olenichenko N.A., Klimov S.V., Astakhova N.V., Zhivukhina E.A., Trunova T.I. *Fiziologiya rastenii*, 2005, 52: 366-371.
10. Zagorskina N.V., Pryadekhina E.V., Lapshin P.V., Yur'eva N.O., Gol'denkova-Pavlova I.V. *Izvestiya RAN (seriya biologicheskaya)*, 2014, 2: 142-149.
11. Shimshilashvili Kh.R. *Izuchenie ekspressii genov, vovlechennykh v modifikatsiyu zhirnykh kislot, na eksperimental'nykh modelyah: Avtoresfat kandidatskoi dissertatsii* [Expression of genes involved in fatty acid modification in experimental models]. Moscow, 2010.
12. Lukatkin A.S., Golovanova V.S. *Fiziologiya rastenii*, 1988, 35: 773-780.
13. Lukatkin A.S. *Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivykh rastenii i okislitel'nyi stress* [Cold damage of heat loving plants and oxidative stress]. Saransk, 2002.
14. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 2004, 55: 373-399.
15. Deryabin A.N., Yur'eva N.O. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 2010, 3: 17-25.
16. Demin I.N., Shimshilashvili C.R., Yur'eva N.O., Naraykina N.V., Gol'denkova-Pavlova I.V., Los D.A., Nosov A.M., Trunova T.I. Overexpression of the acyl-lipid delta12-desaturase gene protects potato plants from low temperature damage. *Acta Agronomica*, 2011, 59: 87-99.