

На правах рукописи



Демин Илья Николаевич

**Участие Δ 12-ацил-липидной десатуразы
в формировании устойчивости
растений картофеля к гипотермии**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории зимостойкости Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор

Трунова Тамара Ильинична

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор

Шакирова Фарида Миннихановна

доктор биологических наук

Носов Александр Владимирович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

Защита состоится «27» апреля 2010 г. в 13.00 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс (495) 977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан «26» марта 2010 г.

Ученый секретарь совета
по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Большинство растений на Земле, обитающих на 64% территории суши, в течение года испытывают губительное действие низких температур. Значимость этой проблемы возрастает также в связи с глобальным изменением климата на планете, которое сопровождается усиливающейся нестабильностью, выражающейся, в частности, в резких перепадах температуры в относительно короткие промежутки времени (Levitt, 1980; Сандухадзе и др., 2003). Поэтому проблема устойчивости растений к низким температурам имеет большое фундаментальное и прикладное значение в современной науке.

В настоящее время выдвинуто несколько теорий, объясняющих механизмы повреждения растений от действия низких температур, но наиболее изучен этот вопрос в отношении морозостойких растений (Туманов, 1979, Трунова, 2007). Среди причин повреждений теплолюбивых от действия экстремально низких температур наиболее часто называют повышенное образование активных форм кислорода (АФК) (Мерзляк, 1989, Лукаткин 2002, Попов и др., 2006), которые способны необратимо повреждать главным образом липидные компоненты мембран и, в первую очередь, полиненасыщенные жирные кислоты (Terreman, Dunsmuir, 1990, Apel, Hirt, 2004, Suzuki, Mittler, 2006). Это приводит к повышению вязкости мембран, переходу липидов из жидкокристаллической фазы в фазу геля, увеличению протонной проницаемости, снижению электрической проводимости мембран и инактивации мембранных ферментов (Лось, 1997, Лось 2005). При продолжительном воздействии стресс-факторов такие изменения становятся необратимыми, что ведет к многочисленным нарушениям работы биологических систем и гибели растений. Вместе с тем, причины повреждений и устойчивости группы холодостойких растений к низким температурам, изучены в гораздо меньшей степени. В частности, остаются недостаточно исследованными механизмы, предотвращающие развитие окислительного стресса при гипотермии.

Известно, что способность клеток растений к низкотемпературной адаптации связана с их возможностью изменять текучесть мембран посредством увеличения количества полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембранных липидах. По сравнению с неадаптированными растениями, в мембранах закаленных растительных организмов наблюдается накопление линолевой (C18:2) и линоленовой (C18:3) жирных кислот (ЖК) (Белоус, Бондаренко, 1982). В связи с этим, важное значение приобретают исследования роли десатураз – ферментов, отвечающих за образование двойных (C=C) связей в цепях ЖК. Первая двойная связь, как правило, формируется после 9-го атома углерода (положение $\Delta 9$), вторая двойная связь – в положении $\Delta 12$, третья – в положениях $\Delta 15$ и $\Delta 6$. У цианобактерий, растений и практически всех живых организмов существуют специфические десатуразы, ответственные за образование двойных связей в определенных положениях ацильных цепей. В частности, $\Delta 12$ -ациллипидная десатураза, функциональная роль которой изучается в данной работе, участвует в образовании второй двойной связи при переходе олеиновой (18:1) в линоле-

вую (18:2) кислоту. Однако выяснено, что не все типы десатураз вносят одинаковый вклад в формирование низкотемпературной устойчивости. Так, применительно к цианобактериям, считается, что наличие в мембранных липидах линолевой (C18:2) кислоты, а, следовательно, и активность $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы может служить одним из критериев устойчивости организма к воздействию низкотемпературного стресса (Wada et al., 1990, Tasaka et al., 1996).

У высших растений участие десатураз в формировании низкотемпературной устойчивости до сих пор изучено мало (Маали и др., 2007). Можно предположить, что экспрессия в холодостойких растениях картофеля гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы приведёт к увеличению полиненасыщенности жирных кислот мембранных липидов, изменению функционального состояния мембран и, в конечном итоге, повышению устойчивости растений к окислительному стрессу и гипотермии, что может послужить экспериментальным доказательством участия этого фермента в формировании холодоустойчивости растений.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы явилось изучение роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному действием гипотермии, на примере картофеля, трансформированного геном *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis sp.*

В соответствии с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи:

1. Подтвердить наличие и экспрессию гетерологичного гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в тканях растений-трансформантов
2. Изучить влияние введённого гена *desA* на состав и содержание жирных кислот в мембранных липидах растений картофеля
3. Установить вызванные трансформацией изменения в ультраструктуре хлоропластов, как основных поставщиков АФК в растительных клетках и в интенсивности CO_2 -газообмена листьев исследуемых генотипов растений в норме и при пониженных температурах
4. Исследовать изменения интенсивности начальных процессов окислительного стресса и содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также показатели активности основных ферментов антиоксидантной защиты под влиянием гипотермии у трансформированных и нетрансформированных растений картофеля
5. Определить различия в устойчивости между контрольными и трансформированными растениями по степени повреждения листьев и выживаемости целых растений после действия гипотермии
6. Установить роль $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении образования избыточных количеств АФК при окислительном стрессе, вызванном гипотермией, а также без участия низкой температуры путём обработки растений параоксидом.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости холодостойких растений к окислительному стрессу, индуцированному гипотермией, с использованием растений картофеля, трансформированных геном *desA* цианобактерии *Synechocystis sp.*

Установлено, что экспрессия гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы приводила к увеличению содержания линолевой (18:2), а также линоленовой (18:3) жирных кислот в мембранных липидах листьев картофеля, что сопровождалось повышением общего количества ЖК, и их индекса ненасыщенности.

Увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот в тканях трансформированных растений способствовало формированию более устойчивой к гипотермии структуры хлоропластов, что выражалось в повышении количества гран и общего числа тилакоидов в хлоропластах, а также в поддержании более высокого отношения интенсивности фотосинтеза к темновому дыханию при понижении температуры.

Впервые экспериментально выявлено, что повышение структурно-функциональной стабильности мембран трансформированных растений картофеля, обусловленное активностью $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, способствовало предотвращению избыточной генерации АФК. Это привело к снижению интенсивности процессов окислительного стресса и перекисного окисления липидов и, как следствие, к повышению устойчивости трансформантов к гипотермии, что выражалось в меньшей степени повреждения их листовых пластин, а также в большем проценте выживаемости после воздействия низкими температурами.

Впервые для подтверждения важной роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении накопления избыточных количеств АФК была использована модельная система с применением параквата для инициации свободнорадикального окисления у растений, без воздействия низкой температуры, которая показала, что трансформированные растения характеризуются меньшим, по сравнению с контролем, содержанием начальных и конечных продуктов окислительного стресса и перекисного окисления липидов.

Анализ полученных результатов позволил впервые сформулировать гипотетический механизм влияния экспрессии гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на поддержание структуры и функций мембран растительных клеток в период охлаждения, что позволяет сохранить клеточный гомеостаз и, в конечном итоге, повысить выживаемость растений.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе экспериментальные данные о роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в повышении устойчивости растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией, имеют существенное значение для понимания механизмов формирования низкотемпературной резистентности у холодостойких растений. Теоретические обобщения и совокуп-

ность экспериментальных данных работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов естественнонаучных специальностей разных ВУЗов страны.

Апробация работы. Основные результаты научной работы были представлены на IX международной конференции «Биология клеток *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008), на международной школе-конференции молодых ученых "Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях" (Звенигород 2008), на конференции молодых ученых в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2009), а также на семинарах лаборатории зимостойкости Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2007-2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из которых 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста, включая 5 таблиц, 30 рисунков; библиография содержит 251 название, из которых 163 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования были использованы холодостойкие растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница), трансформированные конструкцией, несущей ген *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу. Конструкция гибридных генов находилась под контролем сильного конститутивного промотора 35S CaMV. Трансформанты также содержали маркерный ген устойчивости к канамицину *nptII*. Контролем служили нетрансформированные растения того же сорта. Растения были получены в результате совместной работы сотрудников ИФР РАН и ИОГен РАН, которым автор выражает глубокую благодарность за предоставленный экспериментальный материал.

Растения размножали микрочеренкованием и выращивали в камере фитотрона ИФР РАН *in vitro* при 24°C и 16 ч освещении люминесцентными лампами белого света (ЛБ-80, освещенность 100 моль квантов/м²·с) в течение 5 недель в пробирочной культуре на 10-13 мл агаризованной питательной среды, приготовленной по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skooge, 1962) с добавлением 2% сахарозы и витаминов.

Холодовую обработку проводили в климатической камере MIR-153 ("SANYO", Япония). Растения в пробирках (без ватно-марлевых пробок) помещали в камеру, предварительно доведя температуру последней до 0°C. В дальнейшем температуру внутри камеры постепенно (со скоростью 0,3°C/мин) снижали до -9°C и выдерживали растения при этой температуре в течение 20, 40 или 60 минут, в зависимости от задач

опыта. Режим температурной обработки растений, т. е. сочетание температуры с продолжительностью её действия был подобран в предварительных опытах, которые показали, что температура -9°C при воздействии от 20 до 60 минут не приводит к нуклеации льда, как правило, губительной для холодостойких растений, но вызывает повреждения, различные по степени в зависимости от устойчивости генотипа, которые отражаются на процессах окислительного стресса. Для исследований использовали листья без черешков, взятые из средней части растений.

Наличие и экспрессию введенных генов подтверждали с использованием молекулярных методов ПЦР и ОТ-ПЦР.

Определение содержания и состава жирных кислот мембранных липидов определяли методом газожидкостной хроматографии (Пчелкин и др., 2001).

Ультраструктуру клеток и хлоропластов листьев контрольных и трансформированных растений исследовали с помощью электронного микроскопа TEMSCAN 100 CX2 («JEOL», Япония), предварительно получив ультратонкие срезы на ультрамикротоме LKB-3 («LKB», Швеция). Морфометрические исследования проводили на приборе MOP-VIDEOPLAN («Reichert», Австрия) на основании просмотра не менее 100 клеток каждого варианта.

Определение интенсивности фотосинтеза и дыхания проводили с помощью установки открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T фирмы «Hartmann und Braun». Камера располагалась в рабочем объеме климатического шкафа «Gronland» (Германия). Изменения проводились при температуре 24°C . Скорость газообмена измеряли сразу же после установления заданной температуры в камере. С целью снижения ошибки опыта, связанной с суточной динамикой фотосинтеза, измерения проводили в одно и то же время – с 9:30 до 14:00.

Скорость образования супероксида определяли методом, в основе которого лежит способность этого радикала восстанавливать адреналин в адrenoхром (Prayog, 1979). Количество супероксидного анион-радикала выражали в относительных единицах скорости (1 отн. ед. = 10^{-3} опт. ед./мин). Специфичность восстановления адреналина супероксидным анион-радикалом была подтверждена ингибированием реакции при добавлении супероксиддисмутазы (100 ед. акт./мин).

Определение содержания перекиси водорода (H_2O_2) проводили с помощью метода, основанного на образовании окрашенного соединения – комплекса пероксида титана (Kumar, Knowles, 1993). Концентрацию H_2O_2 рассчитывали по стандартной калибровочной кривой концентрации перекиси водорода и выражали в ммоль/г сырой массы.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) жирных кислот определяли по методу, основанному на свойствах сопряженных двойных и тройных связей, входящих в состав гидроперекисей липидов, интенсивно поглощать в УФ-области с характерными максимумами (232 нм). Количество ДК выражали в ммоль/г сырой массы (Biddlack, Tappel, 1973, Кейтс, 1975).

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основанному на образовании в кислой среде окрашенного триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом $\lambda = 532$ нм (Стальная, Гаришвили, 1977). Количество МДА выражали в мкмоль/г сырой массы (Жиров и др., 1982).

Холодостойкость исследуемых генотипов картофеля оценивали по индексу повреждения листовых пластин, который определяли путём измерения степени выхода электролитов из повреждённой холодом (-9°C , 40 минут) ткани в водную фазу (Herburn et al., 1986), а также прямым методом определения процента выживаемости контрольных и трансформированных растений картофеля после действия краткосрочного жесткого охлаждения (-9°C , 60 минут).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли при помощи метода, основанного на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы, поступающие из реакции фотоокисления рибофлавина (Beauchamp, Fridovich, 1971). Активность СОД выражали в единицах активности на г сырой массы листьев.

Активность каталазы измеряли по скорости деградации H_2O_2 согласно методике (Kumar, Knowles, 1993). Фиксировали падение оптической плотности за 1 минуту после добавления в ферментный экстракт раствора 100 мкл 0,1М H_2O_2 и выражали активность фермента в ммоль разложившейся перекиси/г сырой массы в минуту.

Определение активности гваякол пероксидазы проводили по методу, основанному на реакции окисления ароматического соединения (гваякола) до окрашенного соединения (тетрагваякола). Активность пероксидазы выражали в ммоль гваякола/г сырой массы в минуту.

Для установления роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении формирования избыточных количеств АФК применили модельную систему для индукции окислительного стресса, основанную на использовании параквата, гербицидные свойства которого связаны с его способностью получать электрон от доноров электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) хлоропластов и передавать его на молекулу кислорода с образованием супероксидного аниона, что приводит к нарушениям фотосинтеза и усиленному образованию АФК (Bowler et al., 1992). У контрольных и трансформированных растений определяли основные показатели окислительного стресса (скорость образования супероксидного радикала, накопление МДА и диеновых конъюгатов) и работу ферментативной составляющей антиоксидантной системы (активность СОД, каталазы, гваякол-пероксидазы). Для проведения данного эксперимента использовали методики, описанные выше.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Statistica for Windows 9.0» (применяли t-критерий Стьюдента для независимых выборок, $P=0,05$) и графопостроителя «Microsoft Office Excel 2007». В экспериментах использовали 4-6-кратную биологическую и 8-12-кратную аналитическую повтор-

ность измерений. В таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-биологический анализ растений-трансформантов. В начале исследовательской работы было необходимо провести выбор линий трансформированных растений с признаками активной экспрессии гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803. Одним из способов доказательства экспрессии того или иного гена является анализ изменения субстрата соответствующего фермента. В работе Маали и др., 2007 были приведены данные по абсолютному содержанию жирных кислот в листьях различных линий растений картофеля, трансформированных геном *desA*. В соответствии с ними были выбраны 2 линии трансформантов, отличающиеся наибольшим содержанием ПНЖК в клетках, а следовательно, обладающие наибольшей активностью Δ 12-ацил-липидной десатуразы. При этом в одном случае последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу (*desA-licBM3*-растения), а в другом (*desA*-растения) – растения несли нативный ген десатуразы *desA*. В ходе проведенной в дальнейшем экспериментальной работы было показано, что отличия в данных по большинству проводимых нами опытов между *desA*- и *desA-licBM3*-растениями были незначительными. Таким образом, можно подтвердить, что десатураза в составе гибридного белка сохраняет способность катализировать образование двойной связи в цепи ЖК и изменять состав ЖК в мембранных липидах (Маали и др., 2007), а лихеназа при этом не привносит побочных эффектов в действие целевого гена десатуразы. В соответствие с этими данными, было решено для изучения роли цианобактериальной Δ 12-ацил-липидной десатуразы в повышении устойчивости трансформированных растений картофеля к гипотермии использовать *desA-licBM3*-растения, как наиболее удобный объект для периодических анализов экспрессии встроенного гена.

Для подтверждения наличия в тканях трансформированных растений введенных генов был использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

На рис. 1 видно, что в тканях трансформантов (в отличие от контрольных растений) присутствуют целевой ген *desA*, репортерный ген *licBM3* и ген устойчивости к канамицину *npt*.

Но наличие гетерологичных генов в составе тотальной ДНК ещё не означает, что эти гены экспрессируются, а их белковые продукты выполняют свои функции. Уровень экспрессии генов может быть определен по количеству образовавшихся мРНК и/или белкового продукта.

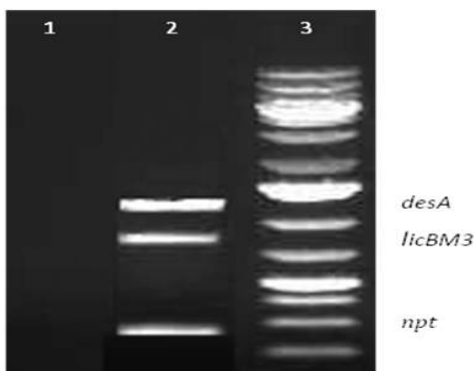


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции ДНК растений картофеля:

- 1) контрольные растения
- 2) *desA-licBM3*-растения
- 3) нуклеотидные маркеры

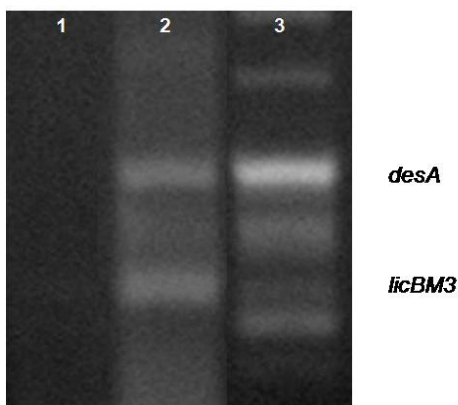


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР-реакции мРНК растений картофеля:

- 1) контрольные растения
- 2) *desA-licBM3*-растения
- 3) нуклеотидные маркеры

Мы оценили уровень экспрессии гибридного гена *desA-licBM3* в клетках растений картофеля на основании метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), то есть по образованию мРНК. Результаты показали, что гетерологичные гены, содержащиеся в тканях трансформантов, хорошо экспрессируются, по крайней мере, на уровне транскрипции (рис. 2).

Качественный и количественный состав ЖК мембранных липидов контрольных и трансформированных растений картофеля. Ферментативная активность $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, осуществляющей образование второй двойной связи линолевой кислоты была, подтверждена анализом абсолютного содержания ЖК в листьях контрольных и трансформированных растений.

Данные показали существенные различия в содержании главных ЖК (таблица 1). Так, содержание линолевой ($\Delta 9,12$ -18:2) кислоты – основного продукта активности $\Delta 12$ -десатуразы – увеличилось у трансформантов почти на 30% по отношению к нетрансформированному контролю.

При этом образование линолевой кислоты, являющейся субстратом для последующего превращения в линоленовую ($\Delta 9,12,15$ -18:3) кислоту, привело к увеличению содержания последней более чем на 25%, что мы связываем с работой растительных десатураз. Здесь следует отметить, что актив-

тивность десатураз зависит от количества соответствующего субстрата (Los, Murata, 1998, Лось 2005), то есть для образования 18:1 требуется ненасыщенная 18:0 кислота, для образования диеновой 18:2 в качестве субстрата необходима моноеновая 18:1 ЖК. Подобным образом можно объяснить то, что количество насыщенной пальмитиновой (18:0) кислоты в тканях трансформантов было меньше, чем у контроля, при этом содержание моноеновой 18:1 ЖК было выше уже у *desA-licBM3*-растений. Выстраивая гипотетическую цепочку биохимических превращений, можно предположить, что активная экспрессия гена *desA* приводила к увеличению количества 18:2. Это потребовало больше субстрата в виде 18:1, а следовательно, и увеличения активности собственных растительных ферментов, превращающих 18:0 в 18:1. В свою очередь, сама линолевая (18:2) кислота тоже является субстратом для образования 18:3.

Таблица 1. Абсолютное содержание главных жирных кислот в листьях контрольных и трансформированных геном *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы растений картофеля*.

ЖК	Состав ЖК, нмоль/г сырой массы	
	Контроль	<i>desA-licBM3</i>
14:0	82	80
16:0	2801	2924
Δ 9-16:1	373	552
Δ 9,12-16:2	65	79
Δ 7,10,13-16:3	379	626
18:0	296	252
Δ 9-18:1	271	346
Δ 9,12-18:2	2054	2668
Δ 9,12,15-18:3	6710	8416
19:0	31	23
20:0	131	137
Сумма ЖК	13193	16103
ИН	2,95	3,71

* Во всех случаях статистическая ошибка не превышала 4%.

служат липиды, содержащие в sn-2 положении Δ 7,10-16:2 кислоту, также представленную в растениях картофеля, можно предположить, что цианобактериальная Δ 12-ацил-липидная десатураза в трансформантах картофеля может использовать в качестве субстрата не только С18-ЖК, но и С16-ЖК. Возможно, что активность именно этого фермента приводила к значительному увеличению содержания Δ 7,10,13-16:3 ЖК в липидах трансформантов линии *desA-licBM3*.

В конечном итоге трансформация растений привела к увеличению общей суммы ЖК в тканях трансформированных растений, а также индекса ненасыщенности ЖК, что является предпосылкой для увеличения холодостойкости трансформантов.

Исследование ультраструктурной организации хлоропластов контрольных и трансформированных растений картофеля

Общее количество жирных кислот в большой степени влияет на мембранную структуру органелл клетки. Изменения в липидном составе мембран, большая часть которых у растений представлена мембранами хлоропластов, позволяет предположить существенные изменения в структуре этих органелл. Изучение ультраструктуры хлоропластов важно с той точки зрения, что способность к фотосинтезу при низкой

Особый интерес представляют данные по содержанию в растениях-трансформантах 16:3-ЖК. Известно, что картофель относится к 16:3-растениям, то есть его хлоропласты содержат Δ 7,10,13-16:3 ЖК. Также известно, что эта кислота, содержащаяся в sn-2 положении фосфатидилдиацилглицеринов хлоропластов, играет большую роль в холодоустойчивости 16:3-растений, вероятно, способствуя процессу фотосинтеза при пониженных температурах. Как следует из результатов таблицы 1., содержание остатков 16:3-ЖК в липидах *desA-licBM3*-растений было на 65% выше, чем в контроле. Поскольку при биосинтезе Δ 7,10,13-16:3 ЖК субстратом

температуре является необходимым условием формирования устойчивости растений к холоду (Климов, 1997).

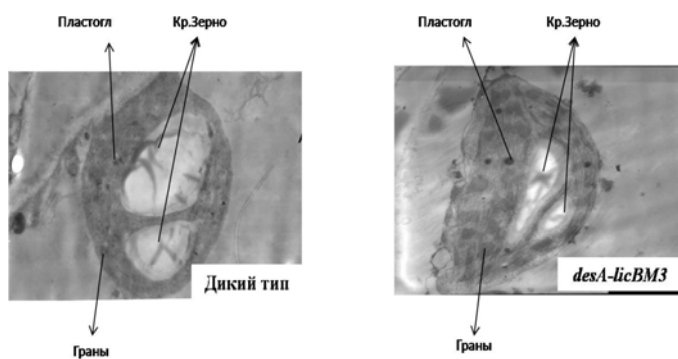


Рис. 3. Ультраструктурная организация хлоропластов листьев контрольных (слева) и *desA-licBM3* (справа) растений картофеля.

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что мембранная система трансформированных растений, по сравнению с контролем, хлоропласты которых имеют рыхлую форму, более развита и упорядочена (рис. 3). На основании морфометрического анализа можно заключить, что при почти одинаковой площади хлоропластов у обоих генотипов, число гран в хлоропластах трансге-

нов увеличено почти на 50%, по сравнению с контролем.

У трансформантов также более, чем на четверть увеличилось количество тилакоидов в гране. Общее же количество тилакоидов в хлоропластах *desA-licBM3*-растений было почти в 2 раза больше, чем у контрольных растений. Количество пластоглобул в хлоропластах трансформантов почти на 20% превышало таковое у не трансформированных растений (таблица 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика структурных элементов хлоропластов листьев контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля.

	Площадь хлоропласта (мк ²)	Площадь крахмальн. зерна (мк ²)	Число гран	Число тилакоидов в гране	Общее число тилакоидов	Количество пластоглобул
Дикий тип	9,10±0,3	1,23±0,1	14,48±0,5	5,75±0,2	83	4,04±0,2
<i>desA-licBM3</i>	9,46±0,3	0,84±0,1	21,48±0,8	7,27±0,2	156	4,81±0,3

По-видимому, все эти изменения ультраструктуры хлоропластов трансформированных растений картофеля, мембраны которых обогащены ненасыщенными жирными кислотами, направлены на поддержание структуры и функции органелл и клеток в целом, что, в конечном итоге, должно приводить к повышению устойчивости.

Определение интенсивности фотосинтеза и дыхания по скорости CO₂-газообмена

Изменения, вызванные введением гена десатуразы, отразились не только на структуре, но и на фотосинтетической функции хлоропластов. С точки зрения изучения фотосинтетических процессов, важным показателем холодоустойчивости являет-

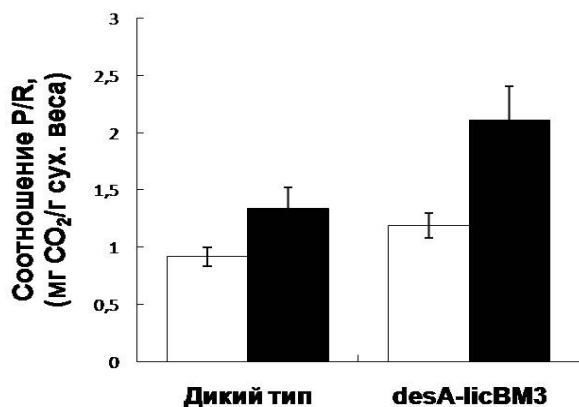


Рис 4. Соотношение интенсивности фотосинтез/дыхание (P/R) у контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и при гипотермии (□ – 24°C, ■ – 8°C).

Это, во-первых, служит предпосылкой для формирования холодоустойчивости растений и накопления в них веществ, защищающих от низкотемпературного стресса (осмолитов, криопротекторов и других), а, во-вторых, может свидетельствовать о том, что ЭТЦ хлоропластов трансформированных растений при гипотермии работают более стабильно, чем у контрольных растений.

Влияние $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на показатели индуцированного гипотермией окислительного стресса у растений картофеля

Известно, что существует обратная корреляция между устойчивостью растений и индуцированной низкими температурами интенсивностью свободно-радикальных процессов в клетках. В связи с этим, представляется возможным оценить участие $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в формировании низкотемпературной устойчивости по показателям окислительного стресса. Кроме того, детальное изучение процессов окислительного стресса, может раскрыть некоторые механизмы повышенной холодоустойчивости того или иного генотипа.

Согласно современным представлениям, причиной повреждения растений при низких температурах считается нарушение структурно-функционального состояния мембран, возникающее при интенсификации свободно-радикальных процессов, индуцируемых АФК (Скулачев, 1996; Мерзляк, 1999; Лукаткин, 2002). Одним из первых соединений, появляющихся в результате свободно-радикальных процессов, является **супероксид-анион**. При действии холода в клетках растений происходит разобщение в работе цепей переноса электронов (Suzuki, Mittler, 2006). При этом в ЭТЦ митохондрий и хлоропластов (Foyer et al., 2006), а также при участии различных НАДФ-Н-оксидаз (ApeI, Hirt, 2004) лишний электрон "сбрасывается" на молекулярный кислород, что ведет к образованию супероксида. Последний, в свою очередь, является своеобразной базой для генерации остальных АФК (Pastori et al., 2000). В связи с этим, важным показателем инициации окислительного стресса является скорость об-

ся более высокое соотношение интенсивности фотосинтеза и дыхания (P/R) у растений, подвергнутых низкотемпературному воздействию.

Результаты эксперимента показали, что после 5-дневного пребывания растений в условиях пониженной температуры (8°C) соотношение фотосинтез/дыхание у трансформантов было выше, чем у контрольных растений (рис. 4). Преобладание фотосинтетических процессов свидетельствует о том, что пластическо-энергетический обмен растений-трансформантов является более активным.

разования радикальных форм кислорода (прежде всего, супероксидного аниона) в растительных клетках.

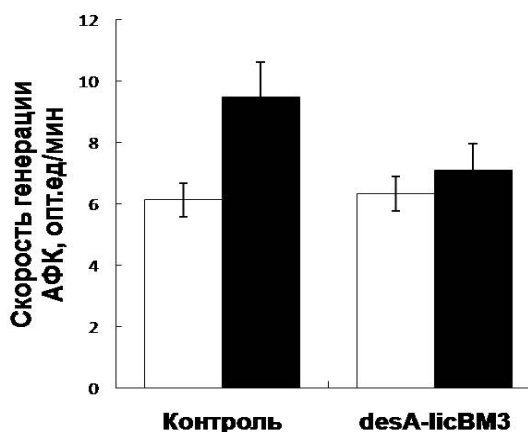


Рис. 5. Скорость образования супероксидного аниона в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 20 мин, –9°C).

На рис. 5 можно видеть, что скорость образования супероксидного радикала, как в листьях растений дикого типа, так и у трансформантов, в нормальных условиях имела сходные значения. Однако после гипотермического воздействия этот показатель значительно вырос (на 55%) у контрольных растений, тогда как у трансформантов достоверно не изменился. Мы связываем это со стабилизацией работы мембран трансформантов при гипотермии, вызванной повышенной активностью $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, обеспечивающей более высокую степень ненасыщенности ЖК мембранных липидов.

Другая форма активированного кислорода, **перекись водорода**, являющаяся результатом ферментативной деградации супероксида супероксиддисмутазой, способна повреждать белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Она легко проникает через биологические мембраны и окисляет важные биополимеры не только в месте ее образования, но и в соседних компартментах и клетках, что может в разы увеличивать степень "окислительного" повреждения растительных тканей при стрессе.

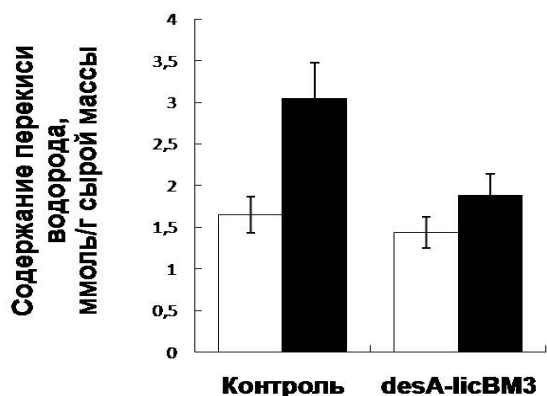


Рис 6. Содержание перекиси водорода в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 20 мин, –9°C).

В наших опытах содержание перекиси водорода при гипотермии в листьях контрольных растений увеличилось более чем на 80% по сравнению с нормальными условиями выращивания. У трансформированных растений это увеличение было не столь значительным (рис. 6). Полученные результаты согласуются с данными, представленными на рис 5., согласно которым скорость генерации супероксида при стрессе сильно увеличивалась у растений дикого типа, а у трансгенных оставалась примерно на том же уровне, что и в нормальных условиях.

Таким образом, изучение двух основных показателей окислительного стресса свидетельствует о более слабой его интенсивности при гипотермии у трансформированных растений, мембранные липиды которых обогащены ПНЖК.

Мы предположили, что снижение генерации избыточных количеств АФК при низкотемпературном стрессе, должно отразиться на процессах перекисного окисления мембранных липидов. В данной работе были изучены первичные и конечные продукты, образующиеся в результате реакций ПОЛ.

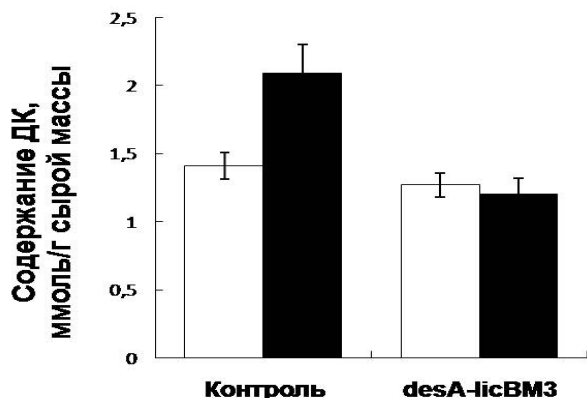


Рис 7. Содержание диеновых конъюгатов ЖК в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 20 мин, -9°C).

Показано, что содержание первичных продуктов ПОЛ – **диеновых конъюгатов** ЖК, возникающих при непосредственном образовании липогидроперекисей, практически не изменилось у трансформированных растений при действии низких температур, тогда как в листьях контрольных растений наблюдалось увеличение этого показателя почти на 50% (рис.7). Следует отметить, что определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) имеет важное значение для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления (Владимиров, 1989).

Данные по изучению диеновой конъюгации свидетельствуют о том, что активность Δ 12-ацил-липидной десатуразы, по-видимому, может оказывать заметное стабилизирующее воздействие на липиды мембран и предотвращать их деградацию в ходе окислительного стресса, вызванного низкими температурами.

Конечным стабильным продуктом ПОЛ является **малоновый диальдегид** (МДА), содержание которого в клетках растений является одним из важнейших показателей их устойчивости к действию низких температур (Лукаткин, 2002). Увеличение количества МДА в клетках при стрессе свидетельствует о деструкции липидных компонентов биомембран в результате окислительного стресса и о более слабой устойчивости растений к гипотермии.

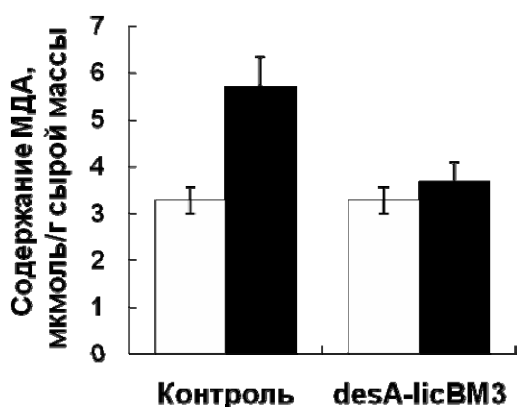


Рис 8. Содержание малонового диальдегида в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 20 мин, -9°C).

Изменение содержания МДА при гипотермии имеет ту же тенденцию, что и показатели диеновой конъюгации ЖК. Количество МДА у контрольных растений при действии низких температур увеличилось более чем на 75% по сравнению с нормальными условиями выращивания. У трансформантов повышение концентрации МДА в клетках было незначительным (рис. 8).

Таким образом, изменения в структуре мембран, вызванные экспрессией гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, способствовали предотвращению инициации окислительного стресса при гипотермии и следующего за ним перекисного окисления липидов.

Изучение активности антиоксидантных ферментов у контрольных и трансформированных растений при гипотермии

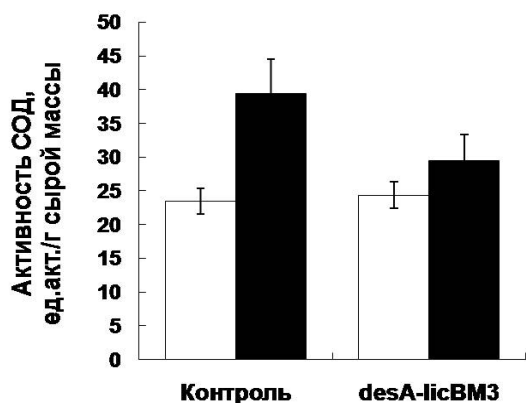


Рис 9. Активность супероксиддисмутазы в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (\square – 24°C, \blacksquare – 20 мин, -9°C).

Содержание АФК при действии низких температур в значительной степени определяется уровнем активности антиоксидантной системы растительных клеток. Поэтому было необходимо провести анализ активности основных ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы гваякола), участвующих в детоксикации АФК.

Основным антиоксидантным ферментом является **супероксиддисмутаза**, которая инактивирует супероксидный анион-радикал с образованием перекиси водорода.

В наших опытах повышение активности фермента в условиях гипотермии наблюдалось только у контрольных растений, тогда как в ли-

стьях растений, трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, возрастание активности СОД было выражено в гораздо меньшей степени (рис. 9). Следует отметить, что транскрипция генов СОД чувствительна к окислительному стрессу и во многом зависит от интенсивности этого процесса (Scandalios, 1993). Учитывая тот факт, что содержание субстрата СОД – супероксидного радикала – на фоне действия повреждающих температур также было повышено только у контрольных растений, (рис. 5), наблюдаемые изменения в активности СОД при гипотермии можно объяснить тем, что низкотемпературное воздействие не вызвало у трансформантов, в отличие от растений дикого типа, сильного окислительного стресса.

Каталаза, как фермент антиоксидантной защиты, отвечает за утилизацию избыточных количеств перекиси водорода. Повышение активности каталазы после охлаждения растений, отмеченное в литературе (Лукаткин, 2002), связывают с увеличением количества H_2O_2 в результате развития окислительного стресса.

Результаты анализов показывают, что в условиях гипотермии уровень активности каталазы в листьях контрольных растений возрос приблизительно в 2 раза, тогда как у трансформантов активность этого фермента увеличилась незначительно (рис. 10).

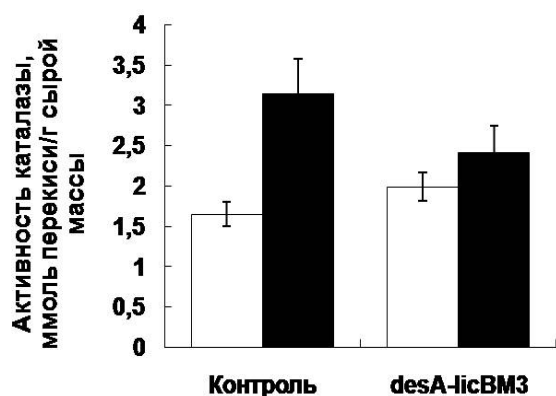


Рис 10. Активность каталазы в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 20 мин, -9°C).

Изменения активности ещё одного антиоксидантного фермента, участвующего в детоксикации перекиси водорода, мембран-связанной **пероксидазы гваякола**, имеют сходную тенденцию с показателями активности каталазы (данные не представлены).

Высокую степень сходства в характере изменений активности гваякол-пероксидазы и каталазы можно объяснить тем, что оба эти фермента, нейтрализующие перекись водорода, в равной степени, конкурируют за субстрат.

Влияние Δ12-ацил-липидной десатуразы на устойчивость растений картофеля к гипотермии

Повышенная устойчивость растений к окислительному стрессу, как правило, сочетается с их более высокой устойчивостью к гипотермии. Одним из наиболее распространенных методов исследования устойчивости теплолюбивых и холодостойких растений к низким температурам является определение уровня повреждений растительных тканей по изменению проницаемости клеточных мембран, что отражается на последующем выходе электролитов из клеток. Основываясь на том, что гипотермическое воздействие, приводящее к интенсификации ПОЛ, должно предшествовать повреждениям листовых пластинок и выходу электролитов из клеток, в данном опыте мы продлили температурную экспозицию при -9°C до 40 мин (вместо 20 мин в предыдущих экспериментах).

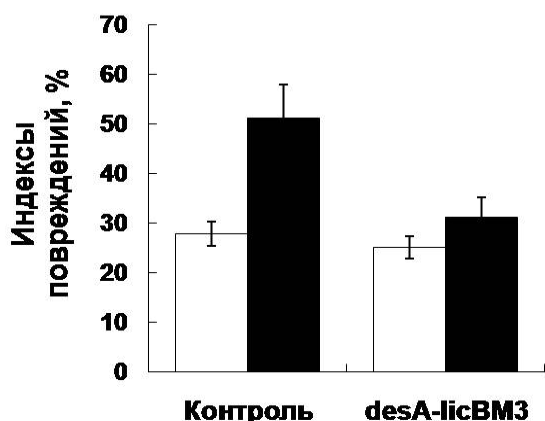


Рис 11. Индексы повреждений листовых пластинок контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля в норме и после охлаждения (□ – 24°C, ■ – 40 мин, -9°C).

Данные, представленные на рис. 11, показывают, что предложенное нами в этом эксперименте низкотемпературное воздействие вызвало значительные **повреждения** листовых пластин контрольных растений и практически не отразилось на состоянии трансформантов. Таким образом, можно сделать вывод, что трансформированные растения проявили большую устойчивость к гипотермии по сравнению с контрольным вариантом.

Это было подтверждено и прямым методом определения **выживаемости** контрольных и трансформированных растений

Таблица 3. Процент выживаемости контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля после действия гипотермии (-9°C , 60 минут)

	Выживаемость, %
Контроль	17±5
<i>desA-licBM3</i>	77±13

после холодового воздействия -9°C в течение 60 минут. Анализ 80 растений каждого варианта показал, что выживаемость контрольных растений не достигала и 20%, в то время как трансформантов выжило более 70% (таблица 3).

Таким образом, экспрессия гетерологического гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в тканях растений картофеля способствует стабилизации состава и функций мембран, тем самым защищая их от негативного воздействия активных кислородных радикалов при гипотермии, что повышает выживаемость растений после действия низких температур.

Роль десатуразы в предотвращении окислительного стресса, индуцированного паракватом

Для подтверждения протекторной роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении генерации избыточных количеств АФК при низкотемпературном стрессе у растений картофеля, была применена модельная система, инициирующая окислительный стресс без охлаждения растений. Такой системой явилась обработка растений паракватом, гербицидные свойства которого связаны с его способностью получать электрон от доноров ЭТЦ хлоропластов и передавать его на молекулу кислорода с образованием супероксидного аниона. В экспериментах использовалась концентрация параквата 1 мМ, которая в предварительно проведённых опытах вызывала наиболее существенные различия в реакциях исследуемых генотипов. Применение подобной системы может дать более чёткое представление о развитии процессов ПОЛ в растительных тканях и о роли цианобактериальной $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении повреждений мембран при действии оксидативного стресса. У обоих генотипов растений определяли основные показатели окислительного стресса (скорость образования супероксида, накопление МДА и диеновых конъюгатов) и работу ферментативной составляющей антиоксидантной системы (активность СОД, каталазы, гваякол-пероксидазы).

Согласно нашим данным, скорости образования супероксидного радикала до обработки паракватом у контрольных и трансформированных растений отличались незначительно (рис. 12). После обработки гербицидом этот показатель вырос у обоих генотипов растений, но если скорость образования $\text{O}_2^{\cdot -}$ в листьях трансформантов увеличилась на 25%, то у контрольных растений увеличение достигло 65%.

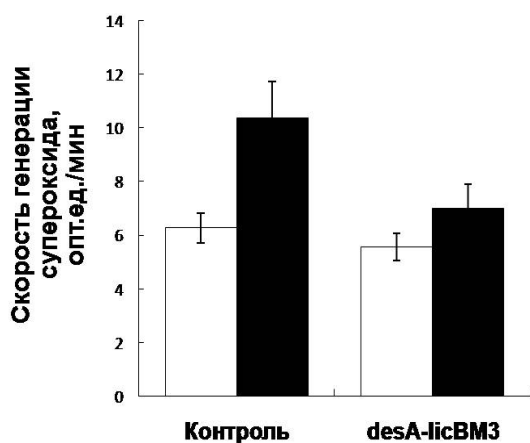


Рис. 12. Скорость образования супероксида в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля до и после обработки паракватом (□ – до обработки, ■ – 1 мМ паракват).

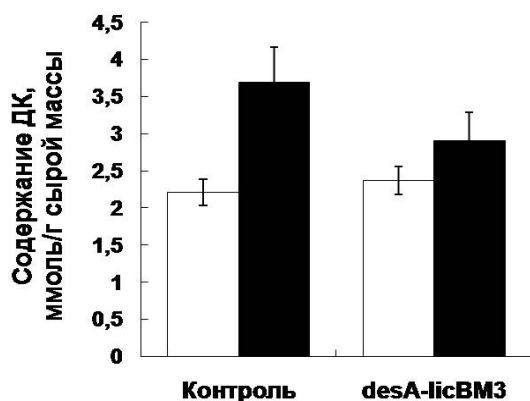


Рис. 13. Содержание диеновых конъюгатов ЖК в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля до и после обработки паракватом (□ – до обработки, ■ – 1 мМ паракват).

Количество **диеновых конъюгатов**, отражающее раннюю стадию окисления ЖК мембранных липидов, увеличилось при действии параквата в гораздо большей степени (на 67%) у нетрансформированных растений. У трансформантов прирост этого показателя оказался не столь значительным (на 23%) (рис. 13).

В применённой нами модельной системе (как и при действии гипотермии) мембранные структуры *desA-licBM3*-растений оказались более устойчивыми к действию окислительного стресса уже на начальных этапах, что должно затормозить дальнейшую деградацию мембран в ходе процессов перекисного окисления липидов.

Действительно, содержание МДА, отражающее позднюю и уже необратимую стадию окисления мембранных липидов, более чем в 2 раза увеличилось у контрольных растений после обработки паракватом, тогда у трансформантов этот показатель изменился в гораздо меньшей степени (рис. 14).

Рассматривая эти данные и сравнивая их с предыдущими результатами по оценке окислительного стресса, полученными при действии низкой температуры, можно сделать вывод, что трансформация растений цианобактериальным геном *desA* Δ 12-ациллипидной десатуразы влияет на стабилизацию мембранных структур растительных клеток, за счёт чего при действии параквата, равно как и при гипотермии, предотвращается избыточная генерация АФК уже на начальных стадиях, что не даёт оснований к дальнейшему развитию окислительного стресса и препятствует необратимым повреждениям тканей трансформированных растений картофеля.

Показатели активности основных ферментов антиоксидантной системы при обработке растений паракватом также имели сходную тенденцию с этими же данными при действии гипотермии.

Обработка паракватом, вызвавшая значительное усиление генерации АФК в клетках нетрансформированных растений (рис. 12), способствовала повышению ак-

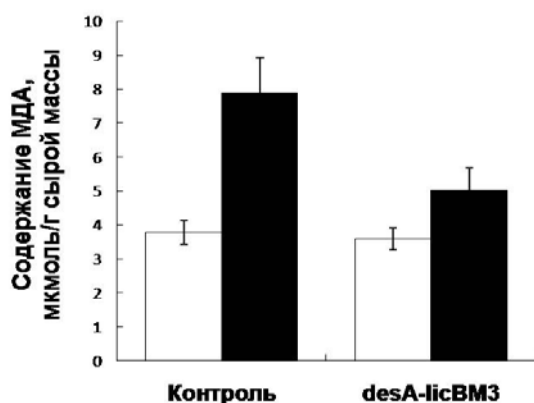


Рис 14. Содержание малонового диальдегида в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля до и после обработки паракватом (□ – до обработки, ■ – 1 мМ паракват).

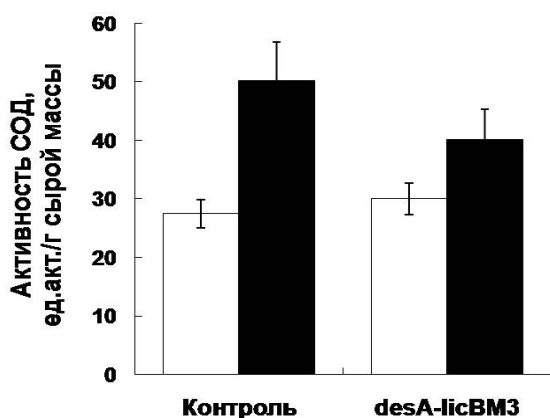


Рис. 15. Активность супероксиддисмутазы в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля до и после обработки паракватом (□ – до обработки, ■ – 1 мМ паракват).

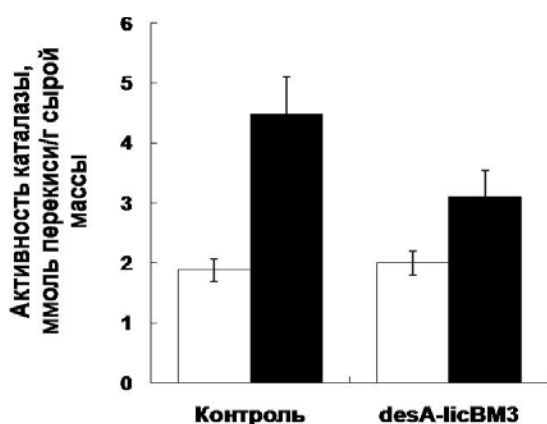


Рис. 16. Активность каталазы в листьях контрольных и *desA-licBM3*-растений картофеля до и после обработки паракватом (□ – до обработки, ■ – 1 мМ паракват).

тивности СОД у контрольного варианта почти на 80%. В листьях трансформантов изменение этого показателя было менее заметным (рис. 15).

На рис. 16, отражающем изменение активности каталазы при обработке паракватом, мы также можем видеть значительное повышение активности фермента у контрольного варианта, тогда как у трансформированных растений увеличение активности каталазы было не столь значительным.

Изменение активности гваяколпероксидазы в опытах с применением параквата имеет сходный рисунок с активностью каталазы в этих условиях (данные не представлены).

В общем, как и в опытах с гипотермией, при действии параквата активность основных ферментов антиоксидантной защиты была значительно повышена у нетрансформированных растений. По нашему мнению, трансформанты не нуждались в столь сильном увеличении активности антиоксидантных ферментов, поскольку окислительный стресс у них был выражен в гораздо меньшей степени по сравнению с контрольными растениями.

Подводя итоги проделанной работы, можно заключить, что гетерологичная $\Delta 12$ -ацил-липидная десатураза способствует увеличению содержания ПНЖК в мембранных липидах, что приводит к более стабильному функционированию мембранных структур и в значительной степени предотвращает “сброс” электрона на кислород и повышенное образование АФК в условиях стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию окислительного стресса, возникающего при охлаждении теплолюбивых растений, особенности этого процесса и механизмы защиты от него у холодостойких растений практически мало изучены. При этом данные о роли десатураз в формировании терморезистентности холодостойких растений, а также механизмы проявления протекторного действия конкретных ферментов, осуществляющих десатурацию жирных кислот биомембран, нуждаются в существенном дополнении. В наибольшей степени, это относится к ацил-липидным десатуразам, функциональная активность которых имеет решающее значение в поддержании текучести мембран в период действия низких температур (Lyons, 1976). В связи с этим, использующийся в данной работе типичный представитель группы холодостойких растений картофель (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница), экспрессирующий ген *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, явился удачной моделью для изучения роли Δ 12-ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости холодостойких растений к окислительному стрессу, индуцированному гипотермией.

В ходе исследований показано, что экспрессия в тканях растений картофеля гетерологичного гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы приводила к увеличению доли полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах (в особенности 18:2 и 18:3), а также индекса их ненасыщенности и общего количества жирных кислот.

Повышение уровня содержания ЖК привело к увеличению мембранных структур хлоропластов (в частности, гран и тилакоидов) трансформированных растений. Структурно-функциональная стабильность мембран трансформированных растений картофеля, обусловленная активностью Δ 12-ацил-липидной десатуразы, способствовала предотвращению избыточной генерации АФК, что привело к снижению интенсивности окислительного стресса и перекисного окисления липидов при гипотермии. За счёт этого трансформанты приобрели повышенную устойчивость и выживаемость после действия низких температур.

Применение модельной системы (обработка разобщающим агентом – паракватом) для инициации окислительного стресса без участия низкой температуры позволило подтвердить важную роль цианобактериальной Δ 12-ацил-липидной десатуразы в предотвращении формирования избыточных количеств АФК при стрессе и защите важнейших биологических мембран от деструктивного действия процессов свободнорадикального окисления.

Каким же образом реализуется стресс-протекторное действие введённого в растения картофеля гена Δ 12-ацил-липидной десатуразы? Анализ полученных в ходе экспериментальной работы данных позволил впервые сформулировать гипотетический механизм влияния экспрессии гетерологичного гена *desA* Δ 12-ацил-липидной

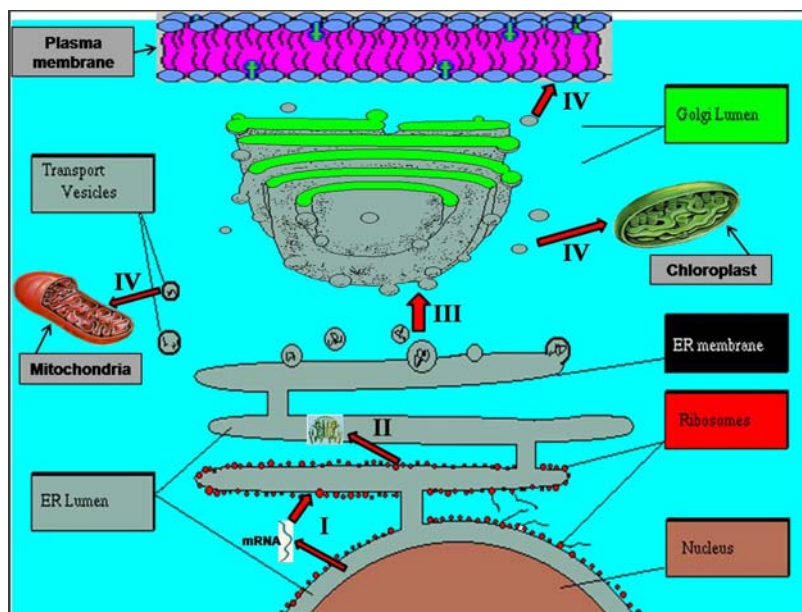


Рис. 17. Гипотетическая схема влияния экспрессии гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы на поддержание структуры и функций клеточных мембран растений картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница).

- I. Транскрипция гена *desA* происходит в ядре, затем мРНК выходит из ядра через ядерные поры и попадает на рибосомы ЭПР
- II. На рибосомах происходит трансляция белка Δ 12-ацил-липидной десатуразы, после чего липофильный белок попадает в мембранные структуры ЭПР, где катализирует образование второй двойной связи линолевой (18:2) кислоты. По-видимому, далее происходит образование линоленовой (18:3) кислоты за счёт активности собственных растительных десатураз
- III. Образовавшиеся ПНЖК в составе липосом транспортируются в аппарат Гольджи, где происходит их перераспределение
- IV. Далее липосомы переносят ПНЖК из аппарата Гольджи в мембранные структуры клеточных органелл (митохондрии, хлоропласты, цитоплазматическая мембрана). По-видимому, таким же образом в составе липосом способен переноситься и белок Δ 12-ацил-липидной десатуразы.

десатуразы цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 на повышение устойчивости трансформированных растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному действием гипотермии (рис. 17).

Очевидно, что целевой ген *desA* при трансформации растений картофеля встроился в ядерный геном. Соответственно, процесс транскрипции происходит в ядре растительной клетки. После завершения транскрипции мРНК выходит из ядра через ядерные поры и попадает на рибосомальный аппарат эндоплазматического ретикулума, где и происходит трансляция белка Δ 12-ацил-липидной десатуразы. Следует отметить, что по структуре и функциям цианобактериальная Δ 12-ацил-липидная десатураза (ген *desA*) напоминает Δ 12-ацил-липидную десатуразу растений (ген *fad2*) (Лось, 1997). По-видимому, после завершения трансляции она, подобно растительному ферменту, попадает с рибосомального аппарата в ЭПР, где и осуществляет образование линолевой (18:2) кислоты из олеата (18:1). В дальнейшем, растительные десатуразы могут образовать из линолевой линоленовую (18:3) кислоту. Затем образо-

вавшиеся ПНЖК в составе всевозможных везикул и липосом транспортируются в аппарат Гольджи, откуда происходит дальнейшее их перемещение с последующим встраиванием в мембранные структуры клетки (плазмалемму, митохондрии, хлоропласты). Таким же образом из ЭПР и аппарата Гольджи во внешние мембранные структуры может переноситься и сама десатураза.

Таким образом, показано, что постоянное поддержание текучести мембран посредством активной работы $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы имеет большое значение в формировании устойчивости растений картофеля к окислительному стрессу, развивающемуся в ходе охлаждения. Это происходит благодаря увеличению жидкостных свойств мембран за счёт повышенной активности $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, что, во-первых, способствует снижению интенсивности образования активных форм кислорода при низкотемпературном стрессе, а во-вторых, обеспечивает текучесть мембран при охлаждении, тем самым, сохраняя клеточный гомеостаз и поддерживая функциональную активность мембран-связанных белков в условиях гипотермии. Всё это в конечном итоге приводит к повышению устойчивости к действию низких температур картофеля, как типичного представителя группы холодостойких растений.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждено наличие и экспрессия гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803*. в тканях трансформантов картофеля с помощью методов ПЦР, ОТ-ПЦР и анализа продуктов реакции десатурации.
2. Трансформированные растения отличались от контроля повышенным содержанием в листьях полиненасыщенных ЖК, общего количества ЖК, а также индекса их ненасыщенности.
3. Повышение общего количества ЖК в листьях трансформантов отразилось на структуре хлоропластов: отмечено увеличение по сравнению с контролем количества пластоглобул, гран, числа тилакоидов в гране и общего количества тилакоидов.
4. Изменения в структуре хлоропластов, вызванные введением гена десатуразы, отразились на фотосинтетической функции растений: трансформанты отличаются от контроля более высоким отношением интенсивности фотосинтеза к темновому дыханию при гипотермии, что служит показателем повышенной устойчивости мембран к действию низкой температуры.
5. Повышение структурно-функциональной стабильности мембран трансформированных растений картофеля, вызванное действием $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, способствовало предотвращению избыточной генерации АФК, что выразилось в меньшей, по сравнению с контролем, интенсивности окислительного стресса и перекисного окисления липидов при гипотермии.

6. Трансформированные растения более устойчивы к гипотермии по сравнению с нетрансформированным контролем, что подтверждено рядом косвенных методов, а также путём прямого охлаждения растений.
7. Эксперименты по обработке растений паракватом, вызывающим окислительный стресс без воздействия низкой температуры, подтвердили протекторную роль $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в предотвращении генерации избыточных количеств АФК, что выразилось в гораздо меньшей интенсивности образования супероксидного аниона, а также начальных и конечных продуктов ПОЛ у трансформантов.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Дёмин И.Н., Антипина О.В., Маали А.Р., Юрьева Н.О., Дерябин А.Н., Синькевич М.С. (2007) Сравнительный анализ устойчивости к гипотермии разновозрастных листьев трансформантов картофеля с введенным геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы. *VII Международный Симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования»*. Материалы симпозиума. М.: Изд-во Рос. ун-та Дружбы народов. Т. 2. С. 121-125.
2. Demin I.N., Deryabin A.N., Sinkevich M.S., Antipina O.V, Trunova T.I. (2007) The enhancement of plant tolerance to hypothermic stress by the introducing of $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene. *2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности»*. Тезисы докладов. Москва. С. 34.
3. Дёмин И.Н., Антипина О.В., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. (2007) Применение метода выхода электролитов для определения устойчивости холодостойких растений к гипотермии. *Международная Конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем»*. Материалы докладов в трёх частях. Сыктывкар. Ч. 2. С. 107-110.
4. Sinkevich M.S., Deryabin A.N., Demin I.N., Trunova T.I. (2007) Chilling tolerance differences of varied potato cultivars and its genotypes acquired through transformation. *Abst. 2nd Intern. Symp. "Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture"* 8-12 October, Kyiv, Ukraine. P. 89.
5. Sinkevich M.S., Deryabin A.N., Demin I.N., (2007) Trunova T.I. Effect of potato plant transformation by yeast invertase and delta-12-acyl-lipid desaturase genes at generation of reactive oxygen species during hypothermia. *Abstr. 2nd Intern. Symp. "Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture"* 8-12 October, Kyiv, Ukraine. P. 111.
6. Дёмин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. (2008) Введение гена *desA* ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией. *Физиология растений*. Т. 55. №5. С. 710-720.
7. Дёмин И.Н. (2008) Содержание диеновых конъюгатов в листьях растений картофеля, трансформированных геном *desA*, при гипотермии. *Материалы VIII Междуна-*

- родной конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений», г. Мичуринск, 8-12 июня. **Т. 3.** С. 32-36.
8. **Демин И.Н.** (2008) Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И.. Влияние гипотермии на генерацию супероксидного радикала и активность супероксиддисмутазы в листьях растений картофеля, трансформированного геном $\Delta 12$ -десатуразы. *Материалы VIII Международной конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений»*. г. Мичуринск, 8-12 июня. **Т. 3.** С. 36-40.
 9. **Дёмин И.Н.**, Юрьева Н.О., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. (2008) Экспрессия гена дельта-12-десатуразы цианобактерии в трансформантах картофеля снижает интенсивность свободнорадикальных процессов. *IX международная конференция "биология клеток in vitro и биотехнология"*. Звенигород. 8-12 ноября. Сборник тезисов. С. 108-109.
 10. **Дёмин И.Н.**, Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. (2008) Влияние экспрессии гена desA в листьях растений картофеля на интенсивность свободнорадикальных процессов при гипотермии. *Годичное собрание ОФР "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений"*. Тезисы докладов международной научной конференции. Екатеринбург. 6-10 октября. С. 157-158.
 11. Маали Амири Р., Голденкова-Павлова И.В., Юрьева Н.О., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Дерябин А.Н., **Дёмин И.Н.**, Трунова Т.И., Лось Д.А., Носов А.М. (2008) Экспрессия гена ацил-липидной десатуразы *Synechocystis* sp. PCC 6803 повышает устойчивость растений картофеля к холодовому стрессу. *Тезисы докладов международной научной конференции "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений"*. Екатеринбург. 6-10 октября. С. 255-256.
 12. Юрьева Н.О., Дерябин А.Н., Мали Амири Реза, Голденкова-Павлова И.В., Соболюкова Г.И., **Дёмин И.Н.** (2008) Холодостойкость трансгенных растений картофеля, экспрессирующих модифицированный ген DES-A. *IX международная конференция "биология клеток in vitro и биотехнология"*. Звенигород. 8-12 ноября. Сборник тезисов. С. 454-455.
 13. **Demin I. N.** (2008) The content of dienoic and trienoic conjugates in leaves of potato plants transformed with a gene of $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase under hypothermia. *Abst. Int. Sc. Conf. «Actualities in Plant Physiology»*. Lithuanian Soc.Plant Physiol., Babtai, June 12-13. P.53.
 14. Шимшилашвили Х.Р., **Демин И.Н.** (2008) Создание трансгенных растений картофеля устойчивых к стрессовым факторам. *Международная школа-конференция молодых учёных: "Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях"*. Звенигород. 7-12 декабря. Сборник тезисов. С. 79.
 15. Sinkevich M.S., Deryabin A.N., **Demin I.N.**, Trunova T.I. (2009) Dynamics of Superoxide Dismutase and Catalase Activities during Acclimation to Hypothermia of Wild-Type and Transformed Potato Plants. *Vagos*. **V. 83 (36)**. P. 72-76.