

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И БИОХИМИЯ

УДК 581.1:581.2:58.084.1

А.А. Ермошин<sup>1</sup>, О.С. Синенко<sup>1</sup>, В.В. Алексеева<sup>2</sup>, И.С. Киселева<sup>1</sup>,  
Е.Б. Рукавцова<sup>2</sup>, А.Ю. Буданцев<sup>3</sup>, Я.И. Бурьянов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Уральский государственный университет им. А.М. Горького (г. Екатеринбург)

<sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Пуцзино)

<sup>3</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пуцзино)

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА *hmg1* НА МЕЗОСТРУКТУРУ ЛИСТА И УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К *Pseudomonas syringae*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-00980 и ФЦП «Научные  
и научно-педагогические кадры инновационной России»  
(ГК № П2364, № П1301 и № 14.740.12.0820).

Проведено исследование влияния экспрессии гетерологичного гена *hmg1* в прямой и обратной ориентациях относительно конститутивного промотора *CaMV 35S* на параметры мезоструктуры листа трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum L.* и их устойчивость к *Pseudomonas syringae*. Обнаружены изменения в содержании суммы стеринов листьев трансгенных линий табака. До цветения растений листья смысловых линий содержали стеринов больше, чем в контроле. Снижение количества стеринов в листьях антисмысловых линий трансгенных растений табака по сравнению с контролем наблюдалось во время цветения. Исследование мезоструктуры листа показало, что в листе антисмысловых форм растений упаковка клеток мезофилла более плотная, чем в контроле за счет уменьшения толщины листа и увеличения количества клеток. Более плотная упаковка клеток, чем в контроле, обнаружена и в листьях растений смысловых линий *C2* и *C4*, но не в линии *C1*. Снижение толщины листа в растениях линий *C2* и *C4* сопровождалось увеличением объема клеток столбчатого мезофилла. Между тем толщина листьев растений линии *C1* не изменялась. Ткань листа этих растений оказалась более рыхлой, чем в контроле. Выявлена корреляция между анатомией листа смысловых форм трансгенных растений табака с геном *hmg1* и их устойчивостью к биотическому стрессу. Устойчивость трансгенных растений табака зависела от уровня экспрессии гена *hmg1*.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum L.*; трансгенные растения; ген *hmg1*; фитостерины; *Pseudomonas syringae*; мезоструктура листа.

Изопrenoиды являются одним из самых многочисленных классов природных соединений растений. Они участвуют как в регуляции роста, развития и размножения растений, так и в процессах взаимодействия растений с абиотическими условиями среды и другими организмами – насекомыми, бактериями, грибами. Биосинтез изопrenoидов в растениях происходит при участии

двух метаболических путей – метилэритритолфосфатного, локализованного в хлоропластах [1], и мевалонатного, находящегося в цитоплазме [2]. Цитоплазматический синтез изопреноидов начинается с конденсации трех молекул ацетил CoA, которые с помощью фермента 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы превращаются в мевалоновую кислоту. Фермент 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза кодируется геном *hmg1* [3]. При участии данного пути биосинтеза образуются такие изопреноиды, как brassinостероиды, фитостерины, некоторые фитоалексины, изопреноидные фрагменты цитокининов и убихинонов [4]. Можно предположить, что усиление биосинтеза мевалоновой кислоты приведёт к росту уровня фитогормонов, стероидов и фитоалексинов, что в свою очередь может сказаться на структуре тканей листа и устойчивости растений к фитопатогенам.

Цель работы – изучение у модельного объекта *Nicotiana tabacum* L. эффектов введения гетерологичного гена *hmg1* в разных ориентациях относительно промотора на структуру листа и устойчивость к биотическому стрессу, вызванному биотрофным фитопатогеном *Ps. syringae*, распространение которого происходит по межклеточному пространству в мезофилле.

### Материалы и методики исследования

Объектом исследования служили трансгенные растения табака сорта Самсун, содержащие гетерологичный ген *hmg1* из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. под контролем конститутивного двойного промотора CaMV 35S вируса мозаики цветной капусты [5]. Линии растений с антисмысловой копией гена *hmg1* (антисмысловые формы) обозначены как A1 и A2, а линии растений со смысловой формой гена *hmg1* (смысловые формы) – C1, C2 и C4. Растения размножали в условиях *in vitro* на среде MC [6] с добавлением 50 мг/л сульфата канамицина и в возрасте 3–4 недель пересаживали в грунт. Далее растения выращивали в условиях закрытого грунта на станции искусственного климата «Биотрон». В работе использовали штамм *Pseudomonas syringae*-1546, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Мезоструктуру листа определяли согласно методике Мокроносова и Борзенковой [7, 8] с использованием программного обеспечения Siams Mesoplant. Определение стероидов проводили колориметрическим методом [9] с небольшими модификациями, измеряя количество стероидов по реакции неомыляемого остатка растительных экстрактов с реактивом Бурхарда–Либермана. Для разделения стероидов на пластинках Silufol использовали систему «гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота» (70 : 30 : 2).

Оценку устойчивости к биотическому стрессу проводили на листьях среднего яруса 8-недельных растений табака. Для этого листовые диски диаметром 20 мм выдерживали 3 мин в ночной культуре *Ps. syringae* либо в воде, после чего инкубировали 42 ч при температуре 24–26°C во влажной камере. Оценивали такие показатели стресса, как уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) [10], активность пероксидазы [11], содержание свободного пролина [12] и флавоноидов [13]. Статистическая обработка и

построение графиков выполнено в программе StatSoft Statistica 8.0 и MS Excel 2003. Все данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки. Статистическая обработка данных проведена с использованием критерия Манна–Уитни. Различия статистически значимы при  $p \leq 0,05$ . Корреляционный анализ проведён с вычислением коэффициента корреляции Пирсона.

### Результаты исследования и обсуждение

Трансгенные растения со смысловой копией гена *hmg1* в геноме являются моделью для исследования влияния усиления мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов в растениях, тогда как трансгенные линии с антисмысловой копией гена *hmg1* позволяют моделировать его ослабление. Полученные нами ранее трансгенные растения табака с геном *hmg1* в разных ориентациях по отношению к промотору (линии А1, А2, С1, С2, С4) создают возможность наблюдать эффекты, связанные с изменением цитоплазматического биосинтеза изопреноидных соединений.

**Морфология растений.** Отличий в высоте, скорости роста и времени начала цветения между контрольными и трансгенными растениями табака нами не обнаружено. Согласно данным других исследований, мутанты по гену *hmg1* отличались низкой высотой растений и задержкой цветения [14]. В нашем случае отсутствие различий в ростовых показателях может быть объяснено недостаточной супрессией гена *hmg1* при использовании технологии антисмысловых РНК.

**Анализ стериннов.** Большинство стериннов растений являются компонентами мембран, отвечая за ее текучесть и проницаемость. Некоторые стерины или продукты их превращений могут служить сигнальными молекулами в процессах роста и развития растений [15]. Механизм, отвечающий за гомеостаз стериннов в растениях, изучен недостаточно, однако показано, что активность 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы табака возрастает при уменьшении эндогенных стериннов [16].

В листьях исследованных нами растений суммарное содержание стериннов изменялось в зависимости от фазы развития. До цветения количество стериннов в листьях контрольных и антисмысловых форм растений не отличалось, тогда как листья смысловых линий растений содержали на 43–57% стериннов больше (рис. 1).

Во время цветения содержание стериннов у контрольных и смысловых линий растений выравнивалось, а в листьях антисмысловых форм растений было на 13–20% ниже. В корнях различий между вариантами по уровню стериннов не обнаружено. Методом ТСХ в экстрактах обнаружено четыре компонента, два из которых определены как ситостерин и стигмастерин. Соотношение между этими стеринами в идентичных органах всех исследуемых линий растений не отличалось. Для выяснения более полной картины изменения состава стериннов в трансгенных растениях планируется проведение их анализа методами газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

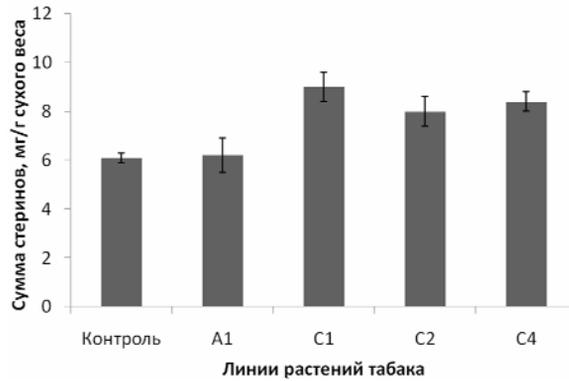


Рис. 1. Содержание стероидов в листьях табака до цветения растений. По оси абсцисс – линии растений табака: контроль – нетрансформированные растения; A1 – трансгенные растения табака с антисмысловой формой гена *hmg1*; C1, C2, C4 – линии трансгенных растений табака со смысловой формой гена *hmg1*

**Мезоструктура листа.** Под мезоструктурой листа подразумевают организацию фотосинтетического аппарата растений на клеточном и тканевом уровнях. Исследование показало, что у антисмысловых линий растений происходило уменьшение толщины листа на 16% (рис. 2) и увеличение количества клеток мезофилла на 59% по сравнению с контролем (рис. 3). При этом размеры клеток столбчатого и губчатого мезофилла изменялись незначительно (линия A1) или увеличивались (линия A2) (рис. 4). Такое изменение данных параметров может свидетельствовать о более плотной упаковке клеток в листе антисмысловых форм растений. У смысловых растений наблюдали различия между линиями. В линии C1 отличий от контроля в толщине листа не было, а листья линий C2 и C4 были на 18–19% тоньше (рис. 2). Количество клеток мезофилла во всех линиях смысловых растений достоверно не изменялось (рис. 3). Объем клеток столбчатого мезофилла увеличивался во всех линиях смысловых растений (рис. 4). Таким образом, в растениях смысловых линий C2 и C4 упаковка клеток в листе более плотная, чем в контроле.

Ткань листа растений линии C1 более рыхлая по сравнению с контролем. Это подтверждается расчетными данными доли мезофилла в объеме листа и индексом поверхности наружных мембран клеток, представленными в таблице. Удельная поверхностная плотность листьев у антисмысловых линий не отличалась от контроля, тогда как у смысловых линий она была выше на 8–30% (рис. 5). Это может свидетельствовать как об увеличении степени васкуляризации листа смысловых форм растений, так и об увеличении толщины кутикулы листа. Возможно, в растениях со смысловой формой гена *hmg1* повышен уровень brassinosteroidов, которые стимулируют развитие элементов ксилемы в листе и стебле, либо уровень изопреноидов, входящих в состав кутикулы. В настоящее время проводится проверка данного предположения.

Наблюдаемые различия в плотности упаковки клеток листа могут быть одним из факторов изменения устойчивости трансгенных растений к биоти-

ческому стрессу, возможно, за счёт изменения скорости распространения патогена по тканям растений.

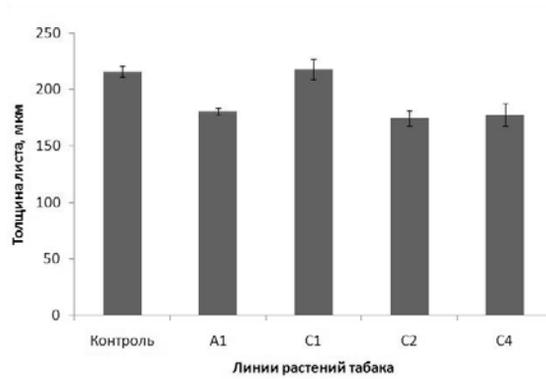


Рис. 2. Толщина листа у контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1*

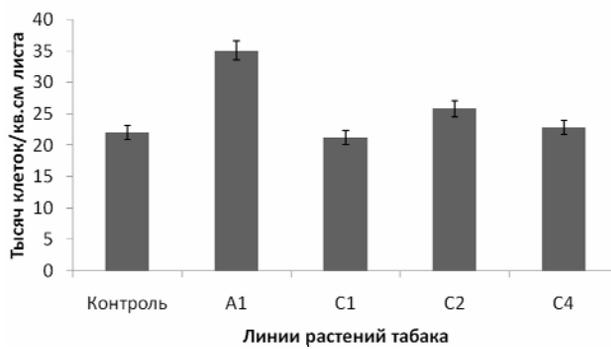


Рис. 3. Количество клеток мезофилла в листьях табака

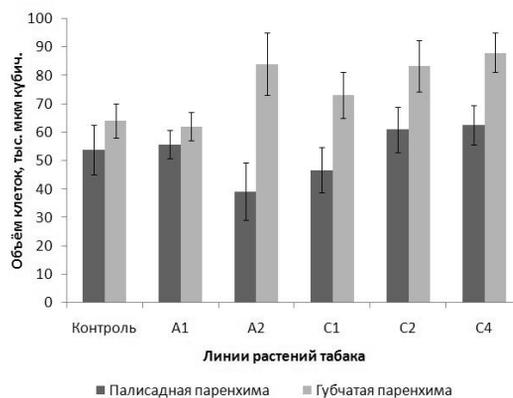


Рис. 4. Объем клеток мезофилла в листьях табака

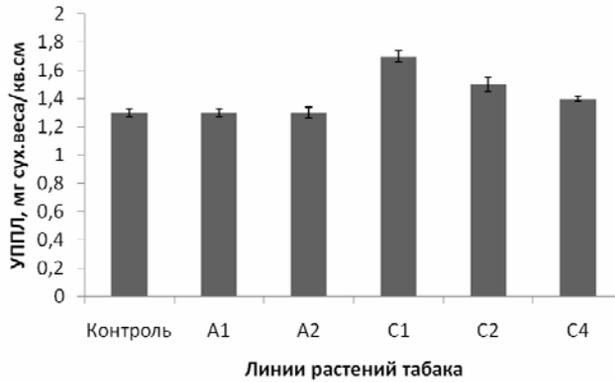


Рис. 5. Удельная поверхностная плотность листьев (УППЛ)

#### Расчётные показатели мезоструктуры листа

Линия растений табака	Индекс мембран клеток	Доля мезофилла в объёме листа
Контроль	1,9	0,3
A1	3	0,46
C1	1,9	0,25
C2	2,5	0,4
C4	2,3	0,51

**Устойчивость к биотическому стрессу.** Цитокинины и брассиностероиды, синтез которых связан с мевалонатным путем, играют значительную роль в адаптации растений к стрессам [17, 18]. Кроме того, через этот путь синтезируются и некоторые фитоалексины, которые в семействе пасленовых представлены сесквитерпеноидами [19]. К факторам, влияющим на устойчивость к заболеваниям, помимо гормонов и фитоалексинов относят строение покровных тканей и анатомические особенности листа. В связи с этим изучение устойчивости полученных трансгенных растений к биотическому стрессу представляет значительный интерес. В качестве фитопатогена использовали бактерии *Pseudomonas syringae*. После воздействия бактерией *Ps. syringae* ПОЛ у растений смысловых линий C2 и C4 не изменился, что свидетельствовало об отсутствии у этих линий стресса (рис. 6). В контроле, растениях антисмысловых линий и линии C1 в тех же условиях этот показатель возрос на 40–70%.

Во всех исследуемых вариантах произошло возрастание содержания свободного пролина (рис. 7), но наиболее значительно – у смысловых линий (на 300%), что говорит о высокой сопротивляемости данных растений к действию биотического стресса. На усиление стресса у растений антисмысловых форм и в линии C1 указывало повышение активности гваяколовой пероксидазы (рис. 8). При этом в контрольных и растениях смысловых линий C2 и C4 активность фермента не изменялась, свидетельствуя об отсутствии накопления в них перекиси при данном стрессе.

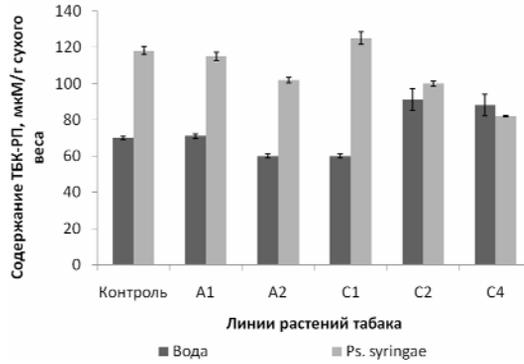


Рис. 6. Уровень перекисного окисления липидов в листьях контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1* после инкубации с *Ps. syringae*. По оси ординат – содержание продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП)

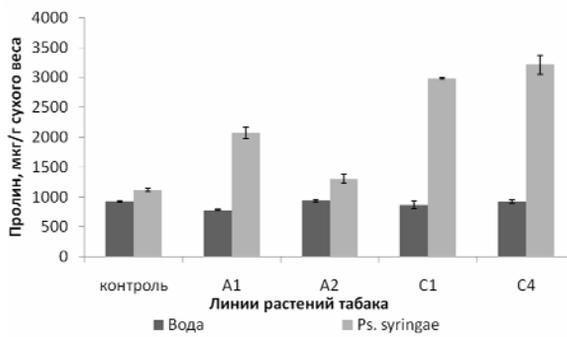


Рис. 7. Содержание пролина в тканях табака после инкубации с *Ps. syringae*

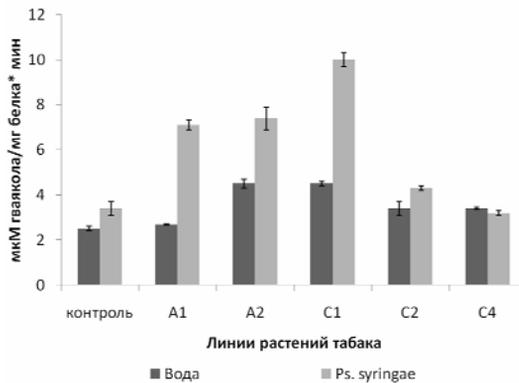


Рис. 8. Активность гваяколовой пероксидазы в листьях растений табака после воздействия *Ps. syringae*. По оси ординат – активность фермента, выраженная в мкМ окисленного за 1 мин гваякола/1 мг белка

Содержание флавоноидов в листьях антисмысловых форм растений повысилось на 12–19%, а в смысловых линиях С2 и С4 – снизилось на 25–29%. В контроле и в линии С1 этот параметр уменьшился на 13 и 15% соответственно. Это может свидетельствовать о росте сопротивляемости растений смысловых линий С2 и С4 к действию патогена за счёт активации синтеза лигнина и тушения активных форм кислорода [20].

На седьмые сутки эксперимента на листовых дисках контрольных и антисмысловых линий растений проявлялись признаки хлороза, указывая на поражающее действие патогена, при этом экспланты смысловых форм растений, в особенности линий С2 и С4, оставались зелёными.

Корреляционный анализ взаимосвязи плотности упаковки листа и физиологических показателей стресса для контрольных растений и линий С1, С2 и С4 подтверждает, что плотность упаковки листа играет значительную роль в формировании устойчивости к исследованному фитопатогену. Показаны сильная обратная корреляция ( $r = -0,9$ ) между долей мезофилла листа в этих растениях и уровнем ПОЛ в них после воздействия патогена, а также средняя обратная корреляция ( $r = -0,7$ ) между долей мезофилла листа и активностью пероксидазы. Для антисмысловых линий табака корреляции между данными признаками не выявлено. Все эти факты говорят о повышенной устойчивости к биотическому стрессу растений смысловых линий С2 и С4 и о снижении устойчивости у растений табака с антисмысловой копией гена *hmg1*. Можно сделать вывод, что экспрессия гена *hmg1* вызывает повышение устойчивости трансгенных растений к действию биотического стресса. Для объяснения пониженной устойчивости к нему смысловой линии С1 в настоящее время проводится анализ уровня экспрессии гена *hmg1*.

Таким образом, исследована экспрессия гена *hmg1* в различных ориентациях по отношению к промотору в трансгенных растениях табака. Показаны изменения в содержании суммы стероидов листьев растений, появление отличий в анатомии листа и повышение устойчивости некоторых трансгенных растений к *Pseudomonas syringae*.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Н.В. Чукиной (Уральский государственный университет им. А.М. Горького, г. Екатеринбург) за помощь в приготовлении срезов листьев.

### Литература

1. Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants // Nat. Prod. Rep. 1999. Vol. 16. P. 565–574.
2. Bach T.J., Boronat A., Campos N., Ferrer A., Vollack K.U. Mevalonate biosynthesis in plants // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1999. Vol. 34. P. 107–122.
3. Newman J.D., Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning withing the cytoplasmic pathway // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1999. Vol. 34. P. 95–106.
4. Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1995. Vol. 46. P. 521–547.
5. Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена *hmg1* // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.

6. *Murasige T., Skoog F.A.* Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
7. *Мокроносов А.Т., Борзенкова Р.А.* Методика количественной оценки и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции ВНИИ растениеводства. 1978. Т. 61. С. 119.
8. *Борзенкова Р.А., Храпцова Е.В.* Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: Руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2006. 27 с.
9. *Кандюк Р.П.* Методы определения стероидов в морских объектах // *Экология моря.* 2002. Вып. 5. С. 87–90.
10. *Uchiyama M., Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test // *Analytic. Biochem.* 1978. Vol. 86. P. 287–297.
11. *Chance B., Maehly A.C.* Assays catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology.* N.Y.: Academic Press, 1955. P. 764–775.
12. *Bates L.S.* Rapid determination of free proline content for waterstress studies // *Plant Soil.* 1973. Vol. 39. P. 205–207.
13. *Тютчев С.Л., Кудрявцева В.П., Тарлаковский С.А. и др.* Применение методов биохимии в исследованиях по защите растений. Л.: ВАСХНИЛ, Всесоюзный НИИ защиты растений, 1976. 134 с.
14. *Suzuki M., Kamide Y., Nagata N. et al.* Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels // *Plant J.* 2004. Vol. 37. P. 750–761.
15. *Clouse S.D.* Plant development: a role for sterols in embryogenesis // *Curr. Biol.* 2000. Vol. 10. P. 601–604.
16. *Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M-A.* Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 130. P. 334–346.
17. *Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A.* Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century // *Ann. Bot.* 2000. Vol. 86. P. 441–447.
18. *Кулаева О.Н.* Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 263 с.
19. *Плотникова Л.Я.* Иммуитет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям / Под ред. Ю.Т. Дьякова. М.: КолосС, 2007. 359 с.
20. *Полесская О.Г.* Растительная клетка и активные формы кислорода: Учеб. пособие / Под ред. И.П. Ермакова. М.: КДУ, 2007. 140 с.

Поступила в редакцию 03.12.2010 г.

Alexander A. Ermoshin<sup>1</sup>, Olga S. Sinenko<sup>1</sup>, Valeriya V. Alekseeva<sup>2</sup>, Irina S. Kiselyova<sup>1</sup>,  
Elena B. Rukavtsova<sup>2</sup>, Arcady Yu. Budantsev<sup>3</sup>, Yaroslav I. Buryanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ural State University, Department of Plant Physiology and Biochemistry, Ekaterinburg, Russia

<sup>2</sup>Branch of Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>3</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Russia

#### STUDY OF INFLUENCE OF HETEROLOGOUS *hmg1* GENE ON LEAF MESOSTRUCTURE AND RESISTANCE OF THE TRANSGENIC TOBACCO PLANTS TO *Pseudomonas Syringae*

*Isoprenoids are one of the most numerous classes of natural plant compounds. Cytoplasmic synthesis of isoprenoids begins from the formation of mevalonic acid by the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase encoded by the hmg1 gene. Transgenic*

tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. variety Samsun, containing the heterologous *hmg1* gene from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in forward (lines C1, C2, C4) and reverse (lines A1, A2) orientations towards double constitutive cauliflower mosaic virus promoter CaMV 35S were obtained. The effects of heterologous *hmg1* gene expression on leaf mesostructure and resistance of transgenic tobacco plants to *Pseudomonas syringae* were studied. There was a change in total amount of leaf sterols in transgenic tobacco plants associated with the proposed modification of isoprenoid compounds synthesis in these plants. Before plant flowering leaves of transgenic plants with sense *hmg1* gene contained significantly more sterols compared to control. Reducing of sterol amount in leaves of antisense transgenic tobacco lines compared to control was observed during flowering. Study of leaf mesostructure has shown that mesophyll cells package in antisense plant lines is more dense than in control due to the reducing of leaf thickness and increase in cells number. More dense leaf cells package in leaves of plant sense lines C2 and C4, but not in line C1, compared to control was found. Reducing of leaf thickness in C2 and C4 plant lines was accompanied by an increase in palisade cell volume. Meanwhile, the leaf thickness of C1 plants line did not change. The leaf tissue of these plants was more porous than in control. The density of leaf cells package may affect the rate of pathogens' spreading under biotic stress. After exposure of leaf disks to phytopathogen *Pseudomonas syringae* the level of lipid peroxidation in plants of lines C2 and C4 was not changed, indicating that they have no stress. It increased by 40–70% in control plants, antisense lines and line C1. There was an increase in proline level after stress in all plants, but most significantly – in sense plant lines (up to 300%). In addition, the increase of guaiacol peroxidase activity indicated increase of stress in antisense plants and in plants of C1 line. As the enzyme activity didn't change in control plants and in plants of sense lines C2 and C4 under the stress, testifying the absence of peroxide accumulation in them.

Correlation between leaf tissue structure and resistance to biotic stress in sense transgenic *hmg1* gene plant lines was revealed. The resistance of transgenic tobacco plants depended on the *hmg1* gene expression level.

**Key words:** *Nicotiana tabacum* L.; transgenic plants; *hmg1* gene; phytosterols; *Pseudomonas syringae*; leaf mesostructure.

Received December 3, 2010