

# The Physiological and Biochemical Mechanisms Providing the Increased Constitutive Cold Resistance in the Potato Plants, Expressing the Yeast *SUC2* Gene Encoding Apoplastic Invertase

A.N. Deryabin, T.I. Trunova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences,  
Botanicheskaya street 35, Moscow, 127276, Russia

\*E-Mail: [trunova@ippras.ru](mailto:trunova@ippras.ru)

Received April 18, 2016

The expression of heterologous genes in plants is an effective method to improve our understanding of plant resistance mechanisms. The purpose of this work was to investigate the involvement of cell-wall invertase and apoplastic sugars into constitutive cold resistance of potato (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée) plants, which expressed the yeast *SUC2* gene encoding apoplastic invertase. WT-plants of a potato served as the control. The increase in the essential cell-wall invertase activity in the leaves of transformed plants indicates significant changes in the cellular carbohydrate metabolism and regulatory function of this enzyme. The activity of yeast invertase changed the composition of intracellular sugars in the leaves of the transformed potato plant. The total content of sugars (sucrose, glucose, fructose) in the leaves and apoplast was higher in the transformants, in comparison by WT-plants. Our data indicate higher constitutive resistance of transformants to severe hypothermia conditions compared to WT-plants. This fact allows us to consider cell-wall invertase as a enzyme of carbohydrate metabolism playing an important regulatory role in the metabolic signaling upon forming increased plant resistance to low temperature. Thus, the potato line with the integrated *SUC2* gene is a convenient tool to study the role of the apoplastic invertase and the products of its activity during growth, development and formation constitutive resistance to hypothermia.

*Key words:* *Saccharomyces cerevisiae*, *Solanum tuberosum*, invertase, low temperature, sugars, transformed plants

Низкая температура (гипотермия) является детерминирующим экологическим фактором, влияющим на все стороны жизнедеятельности растений и определяющим их географическое распространение и продуктивность (Thakur, Nayyar, 2013). Растения, в отличие от животных организмов, ведут прикрепленный к почве образ жизни, поэтому не способны избежать неблагоприятного действия экстремальных температур, нарушающих их рост и развитие. Отсутствие механизмов регуляции теплового режима вынуждает растения адаптироваться к колебаниям температуры окружающей среды. В ходе эволюции у растений сформировались механизмы устойчивости к действию низкотемпературного стрессора, представляющие собой комплекс морфофизиологических и биохимических приспособлений (Janská *et al.*, 2010).

По ответной реакции на гипотермию все высшие растения разделяют на теплолюбивые, повреждающиеся при температуре ниже 8-10°C и имеющие механизм адаптации к ограниченному диапазону действия пониженных температур (кукуруза, огурец, подсолнечник, рис, соя, табак, хлопчатник и др.); холодостойкие, выдерживающие низкие температуры, не сопровождающиеся льдообразованием в их тканях (морковь, картофель, редька и др.), и морозостойкие, способные выживать при действии отрицательной температуры, сопровождающейся образованием (нуклеацией) межклеточного льда (деревья, кустарники, озимые злаки) (Трунова, 2007).

Проблема устойчивости высших растений к низкой температуре (гипотермии) разрабатывалась на

протяжении более 100 лет. В нашей стране её основы наиболее полно были отражены в ставшей классической работе Н.И. Максимова «Зимостойкость растений» (Максимов, 1952). В дальнейшем проблема изучения механизмов повышения устойчивости к гипотермии у группы морозостойких растений получила развитие в трудах И.И. Туманова, С.Н. Дроздова, О.А. Красавцева, Г.А. Самыгина, А.Ф. Титова, Т.И. Труновой и др. За рубежом эту проблему наиболее полно раскрыл в своей монографии Дж. Левитт (Levitt, 1980).

Низкотемпературная адаптация – процесс формирования свойств холодо- или морозостойкости растений в соответствующих генотипу условиях включает, в частности, быстрый ответ на изменение гомеостаза, перепрограммирование углеводного метаболизма и стабилизацию нового состояния метаболического гомеостаза относительно углеводного метаболизма (Трунова, 2007; Nägele *et al.*, 2011). Накопление низкомолекулярных растворимых сахаров является одним из обязательных условий формирования повышенной устойчивости растений к гипотермии (Levitt, 1980; Трунова, 2007; Yuanyan *et al.*, 2009). Учитывая полифункциональную роль сахаров в формировании устойчивости растений к гипотермии (Krasavina *et al.*, 2014), особый интерес представляет один из ключевых ферментов углеводного метаболизма –  $\beta$ -фруктофуранозидаза (инвертаза, К.Ф. 3.2.1.26), катализирующая необратимую реакцию гидролиза молекулы дисахарида сахарозы с образованием двух нефосфорилированных молекул моносахаров (глюкоза + фруктоза). Необходимо учесть, что

субстрат этой реакции сахара является метаболически неактивным дисахаридом, и для того, чтобы метаболизироваться, ей необходимо гидролизироваться на моносахара, например, с помощью инвертазы.

В растениях инвертазы классифицируют, исходя из их биохимических характеристик (рН оптимум, растворимость и др.) и клеточной локализации. Кислые растворимые инвертазы имеют оптимум активности при рН 3.5–5.5, локализованы в вакуоли (далее вакуолярная инвертаза) и в свободном пространстве клеток – апопласте (далее апопластная инвертаза). Апопластные инвертазы подразделяют на растворимые и нерастворимые, связанные с клеточной стенкой. Растворимые нейтральные/щелочные инвертазы (далее цитоплазматическая инвертаза) имеют оптимум активности при рН 7.0–7.8 и находятся, преимущественно, в цитозоле, но обнаружены также в митохондриях и хлоропластах (Roitsch, Gonzalez, 2004; Fotopoulos, 2005; Murayama, Handa, 2007). Инвертазы выполняют важную роль в изменении состава и соотношения растворимых углеводов в клеточных компартментах, обеспечивают гексозами энергетические процессы, вовлечены в процессы роста и развития растений (Fotopoulos, 2005).

Исследования, касающиеся роли отдельных форм инвертаз, и особенно апопластной, в формировании устойчивости растений к гипотермии, немногочисленны и неоднозначны. Так, например, при действии на растения гипотермии отмечали как увеличение активности апопластной инвертазы (Roberts, 1982; Синькевич и др., 2008; Abdel-Latif,

2008; Nägele *et al.*, 2011; Turhan, Ergin, 2012), так и её снижение (Castonguay, Nadeau, 1998). Изменение активности апопластной инвертазы в ответ на действие гипотермии отмечено у теплолюбивых растений табака (Попов и др., 2013), холодостойкого картофеля (Синькевич и др., 2008) и морозостойкого овса (Колупаев, 1992; Livingston, Henson, 1998). Таким образом, несмотря на наличие положительной корреляции между содержанием в растениях низкомолекулярных сахаров и их устойчивостью к гипотермии, роль апопластной инвертазы в формировании конститутивной холодоустойчивости остается не выясненным.

Принципиально новые возможности для достижения поставленной цели предоставляют генно-инженерные подходы, в частности, использование в исследованиях трансформированных растений, экспрессирующих гены гетерологичных организмов, которые кодируют функциональные гомологи растительных белков с известными функциями. Данный подход позволяет выявить роль продуктов экспрессии этих генов в процессах роста и развития растений, формирования ими устойчивости к стресс-факторам (Jewell *et al.*, 2010). В связи с этим, особый интерес представляет линия растений картофеля с изменённым углеводным метаболизмом, вызванным интеграцией в геном гена *SUC2*, кодирующего инвертазу (КФ 3.2.1.26) *Saccharomyces cerevisiae* апопластной локализации (Sonnewald *et al.*, 1997). Использование гена *SUC2* в качестве целевого гена в трансформантах обусловлено отсутствием точных сведений относительно рН в различных компартментах растительной клетки. Однако известно, что по

сравнению с растительными инвертазами дрожжевая инвертаза имеет более широкий диапазон pH (von Schaewen *et al.*, 1990; Andjelković *et al.*, 2010). Кроме того, инвертаза дрожжей является чужеродной для растений, поэтому её активность не подавляется растительными ингибиторами. В связи с этим, представлялось актуальным выяснение физиолого-биохимических механизмов формирования повышенной устойчивости холодостойких растений картофеля к действию гипотермии, с оценкой вклада ключевого фермента углеводного метаболизма — апопластной инвертазы в этот процесс.

Исследования проводили с нетрансформированными растениями картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Дезире (далее WT-растения) и полученной на их основе линией, трансформированной вектором, содержащим целевой ген *SUC2* под контролем пататинового *B33* промотора класса 1 (далее *B33-inv*-растения или трансформант). Принимая во внимание, что во встроенном векторе ген *SUC2* был поставлен под контроль пататинового *B33* промотора, нами были проведены исследования по подтверждению экспрессии этого промотора в вегетативных органах (стебель, корень, лист). Количественный флюориметрический анализ органной специфичности функционирования *B33* промотора подтвердил высокую тканеспецифичность, но, в тоже время, выявил ограниченную его активность в листьях и, особенно, в корнях картофеля (Дерябин *и др.*, 2003). Учитывая полученные результаты, для дальнейших исследований были использованы листья, как органы, в которых наблюдалась наибольшая активность *B33* промотора.

Вставка трансгена в геном *B33-inv*-растений была подтверждена при амплификации с использованием праймеров, комплиментарных последовательности гена *SUC2*, кодирующего инвертазу дрожжей *S. cerevisiae* (Дерябин *и др.*, 2014). ПЦР-анализ показал присутствие в геноме *B33-inv*-растений соответствующих амплифицируемых фрагментов. Экспрессия гена *SUC2* в геноме *B33-inv*-растений подтверждена методом ОТ-ПЦР на уровне транскрипции. Показано, что синтезируемый геном *SUC2* зрелый белок инвертазы дрожжей, благодаря наличию сигнального пептида ингибитора протеиназы II картофеля, транспортируется из клетки во внеклеточное пространство (апопласт) и находится в этом компартменте в растворимой форме, проявляя высокую ферментативную активность (Дерябин *и др.*, 2014). Этот факт особо актуален, если принять во внимание то, что собственная апопластная инвертаза картофеля является нерастворимой, ионно-связанной с клеточной стенкой (Roitsch *et al.*, 2003).

Эффективность встроенного гена *SUC2* была подтверждена также путём сравнения активности апопластной инвертазы в листьях при оптимальных условиях выращивания растений. Многократно проведённые эксперименты показали, что активность кислой инвертазы всегда была на 25-35% выше у трансформантов (Дерябин *и др.*, 2003; Дерябин *и др.*, 2014). Изучая фенотипические различия между линиями, было отмечено достоверное снижение длины побега и числа междоузлий у *B33-inv*-растений, по сравнению с WT-растениями (Дерябин, Трунова, 2014). Кроме того, трансформанты характеризовались менее развитой корневой системой, меньшей массой

надземной части и большей обводненностью тканей. Основываясь на факте, что исследуемые растения различались активностью инвертаз, мы предположили, что отставание в высоте *B33-inv*-растений связано с ростингибирующим действием сахаров. В литературе имеются сведения о важной роли сахарозы и продуктов её гидролиза в регуляции экспрессии генов, ответственных за рост и развитие растений (Rolland, Sheen, 2005; Hummel *et al.*, 2009). Это подтверждается данными электронно-микроскопических и морфометрических исследований полисадных клеток листьев картофеля, показавших у *B33-inv* растений, по сравнению с контролем, изменения ультраструктуры клеток в сторону ксероморфизма (редукция структурных элементов хлоропластов) (Трунова *и др.*, 2003)

Хроматографический анализ качественного состава углеводов в целых листьях показал преобладание фруктозы, глюкозы и сахарозы (Дерябин, Трунова, 2014). В листьях *B33-inv*-растений, по сравнению с контролем, было выявлено превышение содержания сахарозы и глюкозы более чем на 20% и 11%, соответственно, на фоне минорного содержания фруктозы (Дерябин *и др.*, 2003). Низкому содержанию фруктозы, видимо, причастна фруктокиназа (К.Ф. 2.7.1.4), которая обеспечивает максимальное использование свободной фруктозы в гликолитическом пути. Мы предположили, что повышенное содержание сахаров в листьях *B33-inv*-растений связано с активным гидролизом сахарозы растительной и дрожжевой инвертазами, находящимися в апопласте. Известно, что при поступлении сахарозы в апопласт в количестве,

превосходящем производительность переносчиков флоэмных клеток, она дольше находится в контакте с апопластной инвертазой и, следовательно, больший ее процент подвергается гидролизу (Курсанов, 1984). А образующиеся при этом глюкоза и фруктоза используются на синтез полимеров клеточной стенки и/или транспортируются обратно в клетки мезофилла (von Schaewen *et al.*, 1990), где фосфорилируются гексокиназами (К.Ф. 2.7.1.1) и фруктокиназами, и включаются в метаболизм, в том числе, в путь синтеза сахарозы.

Известно, что у высших растений апопластная инвертаза является ключевым метаболическим ферментом, регулирующим флоэмную разгрузку, контроль уровня сахарозы в свободном пространстве (апопласте) и её транспорт через плазмалемму (Fotopoulos, 2005). Нами было показано (Дерябин *и др.*, 2016), что конститутивно линии растений различались по содержанию сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) в апопласте: суммарная концентрация сахаров у *B33-inv*-растений была на 40% больше, по сравнению с WT-растениями, при этом превышение было связано с большим содержанием фруктозы и глюкозы. Важно отметить, что по содержанию сахарозы в апопласте различий между линиями не выявлено. Таким образом, у *B33-inv*-растений экспрессия гена *SUC2* привела к изменению углеводного метаболизма → увеличению активности апопластной инвертазы, снижению ростовых показателей и повышению содержания внутриклеточных и апопластных сахаров.

Повышенное содержание сахаров у *B33-inv*-растений является не только причиной торможения

роста их побегов и снижения морфометрических показателей, но также предпосылкой для повышения уровня холодоустойчивости. Известно, адаптация растений к низкой температуре в значительной степени обусловлена неспецифическим подавлением их линейного роста (Kasperska, 1985). При этом торможение роста сопровождается кардинальной перестройкой метаболизма, связанной с ингибированием ряда энергоёмких анаболических процессов, что приводит к неспецифическому повышению устойчивости организма (Gupta, Kaur, 2005). Следовательно, рост является интегральным показателем, отражающим степень адаптации растения к окружающей среде.

Важно отметить, что картофель (*S. tuberosum* L.) относится к группе холодостойких растений, способных переносить действие низких положительных температур с последующим возобновлением роста в благоприятных условиях, но, в отличие от морозостойких растений, не устойчив к льдообразованию. Весь диапазон пониженных температур для представителей вида *S. tuberosum* L. можно разделить на три зоны: фоновая  $\approx$  от 10°C и выше, закаливающая  $\approx$  от 8°C до 3-6°C и повреждающая  $\approx$  ниже -4°C (Дроздов и др., 1976). Надземная часть картофеля очень чувствительна к отрицательной температуре, повреждения и частичная гибель всходов наступает при температуре минус 2°C при средней длительности заморозка 5  $\approx$  6 ч (Картофель России..., 2005). По сравнению с дикими представителями рода *Solanum*, такими как *S. commersonii* (ЛТ<sub>50</sub> =  $\approx$ 4,5°C) и *S. acaule* (ЛТ<sub>50</sub> =  $\approx$ 6,0°C), вид *S. tuberosum* L., обладает слабой

устойчивостью к отрицательной температуре (ЛТ<sub>50</sub> =  $\approx$ 3,0°C) (Chen, Li, 1980). Величина ЛТ<sub>50</sub> указывает температуру, вызывающую гибель 50% растений.

Известно, что многие реакции фотосинтеза связаны с мембранами, и температурозависимые изменения в их структуре влияют на скорость фотосинтеза (Kreslavski *et al.*, 2013). Одним из интегральных физиологических показателей растений, реагирующих на изменение температуры, является CO<sub>2</sub>-газообмен. Сравнительное изучение особенностей CO<sub>2</sub>-газообмена показало, что скорость фотосинтеза при световом насыщении была выше у *B33-inv* растений как при температуре 22°C, так и при холодной экспозиции (5°C) (Astakhova *et al.*, 2008). У трансформантов выявлена пониженная холодочувствительность фотосинтетического аппарата. Если у WT-растений снижение температуры измерения с 22°C до 5°C приводило к полной остановке фотосинтеза, то у *B33-inv* растений наблюдали снижение процесса только на 86%. Видимо, более высокие значения скорости фотосинтеза у трансформантов обусловлены более выраженным подавлением нарастания сухой массы листьев, на г которых производился расчет фотосинтеза.

Изучение начальных этапов фотосинтеза, в частности, свойств альтернативных путей переноса электрона, связанных только с фотосистемой I (ФС I), показало, что повышенный уровень сахаров в тканях *B33-inv*-растений не изменил принципиальный план донирования электронов по альтернативным путям, однако усилил накопление П<sub>700</sub> ФС I (Дерябин и др., 2006). Данный факт может быть актуален в процессе

формирования трансформантами устойчивости к гипотермии, когда повышенная генерация активных форм кислорода (АФК) в этих условиях снижает уровень  $P_{700}$  и приводит к фотоингибированию ФС I (Sonoike, 1996; Tjus *et al.*, 2001).

Для оценки степени устойчивости растений картофеля к гипотермии был использован метод определения содержания малонового диальдегида (МДА), как одного из конечных продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, который часто применяют в качестве одного из индикаторов окислительного стресса. Было установлено, что характер изменения процессов ПОЛ зависит от температуры и продолжительности её действия и был менее выражен у *B33-inv*-растений (Дерябин и др., 2007; Deryabin *et al.*, 2005). Учитывая, что картофель является холодостойким растением, нам не удалось выявить достоверные различия (по накоплению МДА в листьях) между исследуемыми линиями, используя 1, 3 и 6 ч холодовые экспозиции при 3 и  $-1^{\circ}\text{C}$ . Однако, в последствии жёсткой гипотермии ( $\approx 7^{\circ}\text{C}$ , 30 мин, без льдообразования) наблюдалось транзиторное изменение ПОЛ с менее выраженным эффектом у *B33-inv*-растений, что свидетельствовало о меньших повреждениях мембран и бóльших репарационных возможностях трансформантов, а, следовательно, об их повышенной конститутивной холодоустойчивости.

Для выявления различий в холодоустойчивости WT-растений и трансформантов был также использован метод определения электропроводности тканей по выходу электролитов. Известно, что высокая чувствительность к понижению температуры липидных компонентов мембран и нарушение гидрофобных

взаимодействий с мембранными белками приводит к потере клеткой контроля над активным транспортом ионов (Bertin *et al.*, 1996). Это, прежде всего, выражается в усилении выхода электролитов из клеток в наружный раствор, из которых 80 % составляют ионы калия. Следовательно, чем выше холодоустойчивость растения, тем меньше нарушаются структура и свойства мембран при действии гипотермии, вследствие чего уменьшается выход электролитов из клеток во внешнюю среду (Prasil, Zamecnik, 1998). Нами были подобраны условия краткосрочного действия отрицательной температуры ( $-12^{\circ}\text{C}$ ; 20 и 30 мин), которые не сопровождались образованием льда, но вызывали повреждения клеток, которые, в зависимости от степени холодостойкости растений, выражались в разной степени. Полученные данные по электропроводности тканей подтвердили результаты по определению содержания МДА и свидетельствовали о повышенной холодоустойчивости трансформантов, по сравнению с WT-растениями (Трунова и др., 2001).

Помимо указанных выше методов, для определения различий в устойчивости к низкой температуре у линий картофеля, был применен метод прямого промораживания. Было установлено, что как отделённые листья, так и целые *B33-inv*-растения, по сравнению с нетрансформированными, были способны выдерживать более низкие температуры (Дерябин и др., 2016). Поскольку трансформанты отличались от WT-растений более высокой активностью апопластной инвертазы и повышенным содержанием низкомолекулярных сахаров (глюкозы и

сахарозы), то различия в холодоустойчивости следует отнести на способность сахаров стабилизировать структурно-функциональное состояние клеточных мембран, не допуская интенсификации свободнорадикальных реакций, происходящих с участием АФК. Следовательно, повышенная конститутивная холодоустойчивость трансформантов – результат влияния изменённого соотношения эндогенных сахаров под действием инвертазы дрожжей. Видимо, один из механизмов повышения холодоустойчивости растений картофеля связан с активацией апопластной инвертазы и накоплением сахаров в листьях (как в клетках, так и в апопласте), которые не только стабилизировали структурно-функциональное состояние клеточных мембран, но также снижали интенсивность свободнорадикальных процессов.

Проведенные исследования с использованием трансформанта картофеля выявили зависимость формирования холодоустойчивости от активности апопластной инвертазы в листьях. Увеличение активности фермента в условиях гипотермии следует рассматривать как часть катаболического процесса, являющегося одним из составляющих стрессовой реакции растений, а саму апопластную инвертазу как стресс-индуцируемый фермент углеводного метаболизма, выполняющий важную регуляторную функцию в модификации внутриклеточного состава сахаров. При этом субстрат апопластной инвертазы (сахароза), а также продукты реакции гидролиза (глюкоза, фруктоза) известны как активные полифункциональные метаболиты, концентрации которых в клетке и апопласте оказывают

существенное влияние на процесс адаптации растений к гипотермии. Важно отметить, что наибольшее количество экспериментальных данных о роли растворимых низкомолекулярных сахаров в адаптации и устойчивости растений к гипотермии получено на морозостойких объектах ~~не~~ озимых злаках, основная стратегия которых состоит в сохранении узла кущения при действии низкотемпературного стрессора (Трунова, 2007). При этом роль растворимых сахаров в устойчивости к гипотермии связана, прежде всего, с их криопротекторным действием на мембранную систему клетки. В связи с этим полученные нами данные дают основание согласиться с утверждением, что в условиях повышения интенсивности свободнорадикальных процессов (в нашем случае при действии гипотермии) более эффективной, чем ферментативная, является защита клеток с помощью низкомолекулярных антиоксидантов, в частности, сахаров (Кения и др., 1993; Tarkowski, Van den Ende, 2015). Из литературы известен факт восстановления моносахарами такого сильного окислителя как перекись водорода ( $H_2O_2$ ), за счёт окисления карбонильной группы (Ленинджер, 1985). На искусственных химических моделях, генерирующих АФК, показано участие сахаров в перехвате  $\cdot OH$ -радикалов (Аверьянов, Лапикова, 1989; Nishizawa *et al.*, 2008; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010; Matros *et al.*, 2015).

Возможный механизм защитного действия сахаров связан с их взаимодействием с мембранами на поверхности бислоя за счёт образования многочисленных водородных связей с липидами



между гидроксильными сахарами и кислородными атомами фосфатов в составе фосфолипидов (Strauss, Hauser, 1986; Sum *et al.*, 2003), а также участием сахаров в замещении молекул воды в структуре фосфолипидов в условиях обезвоживания (Caffery *et al.*, 1988). Однако растворимые сахара являются не только криопротекторами и осморегуляторами, но также основными пластическими и энергетическими субстратами, необходимыми для реорганизации и формирования устойчивой к гипотермии структуры клеток (Tarkowski, Van den Ende, 2015). Концентрация сахаров в клетках является одним из факторов, влияющих на экспрессию генома растений (Koch, 1996). Избыток сахаров, равно как и их недостаток может усилить или подавить экспрессию стресс-индуцибельных генов. Поступающие в цитозоль с помощью STPs (сахар-переносящих белков) из внеклеточного пространства (апопласта) гексозы участвуют в передаче внешних сигналов (Sherson *et al.*, 2003; Ruan, 2012; Proels, Hückelhoven, 2014), регулируют экспрессию генов и контролируют многие морфофизиологические процессы (Gupta, Kaur, 2005). Сахароза также действует как сигнальная молекула, влияя, в частности, на активность протонно-сахарозного симпортера, участвующего в загрузке флоэмы (Gupta, Kaur, 2005; Smeekens *et al.*, 2010). Важно, что белки-переносчики сахарозы могут выступать в качестве их сенсоров, регулируя внеклеточную концентрацию сахарозы и её транспорт через апопласт (Lalonde *et al.*, 1999). Источником сигнала служит транспортировка сахарозы до акцепторных клеток и последующий её гидролиз (Koch, 2004; Roitsch, Gonzalez, 2004; Rolland *et al.*,

2006; Sauer, 2007). Таким образом, влияя на экспрессию генов, сахара избирательно усиливают/ослабляют пути биосинтеза метаболитов (белки, липиды, органические кислоты и др.), что может оказывать влияние на устойчивость растения к гипотермии. Следовательно, управляя синтезом, транспортом и распадом сахарозы, растение регулирует свой рост, развитие и физиолого-биохимические процессы, в том числе устойчивость к гипотермии.

## CONCLUSION

Изучение основных закономерностей формирования устойчивости растений к гипотермии является важным аспектом экологической физиологии, связанным с разработкой фундаментальных основ устойчивости растений к низкотемпературному стрессору. В процессе эволюции холодостойкие растения не сформировали генетически детерминированного механизма устойчивости к отрицательным температурам путем внеклеточного льдообразования. В связи с этим, актуальность проблемы изучения механизмов, участвующих в формировании устойчивости к гипотермии типичного представителя группы холодостойких растений картофеля клубненосного, обусловлена, прежде всего, её значимостью для экологии и сельского хозяйства.

Результаты исследований свидетельствуют, что повышение активности только одного фермента углеводного метаболизма – апопластной инвертазы – привело к существенной перестройке всего метаболизма трансформированных растений картофеля, в том числе, накоплению глюкозы и

сахарозы в их листьях. Следствием изменённого углеводного метаболизма у трансформантов явилось снижение морфометрических и ростовых показателей, что обеспечило им увеличение уровня конститутивной холодоустойчивости. При действии гипотермии уровень сахаров в тканях растений картофеля оказывал регулирующее воздействие на интенсивность ПОЛ, морфофизиологические процессы (рост, фотосинтез, дыхание, структуру хлоропластов и др.) и формирование холодоустойчивости. *B33-inv* растения, клетки которых более обогащены сахарами, в отличие от нетрансформированных растений, имели более эффективную систему защиты, в том числе от АФК, что обеспечило им возможность функционирования в условиях действия низкой температуры. Результаты работы свидетельствуют о принципиальной возможности направленного повышения холодоустойчивости растений картофеля за счёт конститутивной экспрессии встроенного целевого гена *SUC2* инвертазы дрожжей *S. cerevisiae* (апопластный вариант локализации фермента). Полученные результаты указывают на важную роль апопластной инвертазы в индукции устойчивости растений к низкой температуре.

## ACKNOWLEDGMENT

Авторы благодарны сотрудникам лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН и группы Dr. L. Willmitzer из Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Potsdam-Golm, Германия) за любезно предоставленные для экспериментов оздоровленные растения картофеля.

## REFERENCES

- Abdel-Latif A. (2008) Activity of sucrose synthase and acid invertase in wheat seedlings during a cold-shock using micro plate reader assays. *Austr. J. Basic Appl.Sc.*, **2**, 53-56.
- Andjelković U., Pićurić S., Vujčić Z. (2010) Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, **120**, 799-804.
- Astakhova N., Deryabin A., Sinkevich M., Klimov S., Trunova T. (2008) Alteration of source-sink relations in the leaves of *in vitro* plants of two *Solanum tuberosum* L. genotypes under hypothermia. *Horticulture and Vegetable Growing*, **27**, 139-149.
- Aver'yanov A.A., Lapikova V.P. (1989) Relations of sugars and hydroxyl radicals and antifungal toxicity of leaf excretions. *Biokhimiya*, **54**, 1646-1651.
- Bertin P., Bouharmont J., Kinet J.M. (1996) Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice. Changes in chilling-induced electrolyte leakage. *Plant Breeding*, **115**, 268-272.
- Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., Van den Ende W. (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J.*, **277**, 2022-2037.
- Castonguay Y., Nadeau P. (1998) Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold-acclimated crowns of alfalfa. *Crop Science.*, **38**, 1183-1189.
- Caffery M., Tonseca V., Leopold A.C. (1988) Lipid-sugar interactions revealed to anhydrous biology. *Plant Physiol.*, **86**, 754-758.

- Chen H.H., Li P.H. (1980) Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiol.*, **65**, 1146-1148.
- Deryabin A.N., Trunova T.I., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Sabel'nikova E.P., Krylova E.M., Romanov G.A. (2003) Chilling tolerance of potato plants transformed with a yeast-derived invertase gene under the control of the B33 patatin promoter. *Russ. J. Plant Physiol.*, **50**, 449-454.
- Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Astakhova N.V., Sabel'nikova E.P., Trunova T.I. (2005) Influence of expressing yeast-derived invertase gene in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. *J. Therm. Biol.*, **30**, 73-77.
- Deryabin A.N., Sin'kevich M.S., Bukhov N.G., Trunova T.I. (2006) Alternative pathways of photosystem-I-dependent electron transport in two genetically different potato cultivars *in vitro*. *Russ. J. Plant Physiol.*, **53**, 431-438.
- Deryabin A.N., Sin'kevich M.S., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Trunova T.I. (2007) Effect of sugars on the development of oxidative stress induced by hypothermia in potato plants expressing yeast invertase gene. *Russ. J. Plant Physiol.*, **54**, 32-38.
- Deryabin A.N., Berdichevets I.N., Burakhanova E.A., Trunova T.I. (2014) Characteristics of extracellular invertase of *Saccharomyces cerevisiae* in heterologous expression of the *suc2* gene in *Solanum tuberosum* plants. *Biology Bulletin*, **41**, 24-30.
- Deryabin A.N., Trunova T.I. (2014) Morphological and biochemical characteristics of potato plants expressing the invertase gene *SUC2* from *Saccharomyces cerevisiae*, under cultivation *in vitro*. *Tomsk State University Journal of Biology*, **4(28)**, 150-168.
- Deryabin A.N., Berdichevets I.N., Burakhanova E.A., Trunova T.I. (2016) The involvement of apoplastic invertase in the formation of resistance of cold-tolerant plants to hypothermia. *Biology Bulletin*, **43**, 26-33.
- Drozdov S.N., Sycheva Z.F., Budykina N.P., Balagurova N.I., Kholoptseva N.P. (1976) Effect of previous temperature on the frost resistance of plants. *Fiziol. Rast.*, **23**, 385-390. (in Russian).
- Fotopoulos V. (2005) Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *J. Biol. Res.*, **4**, 127-137.
- Gupta A.K., Kaur N. (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. BioSci.*, **30**, 761-776.
- Hummel M., Rahmani F., Smeekens S., Hanson J. (2009) Sucrose-mediated translational control. *Ann. Bot.*, **104**, 1-7.
- Janská A., Marsik P., Zelenkova S., Ovesna J. (2010) Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, **12**, 395-405.
- Jewell M.C., Campbell B.C., Godwin I.D. (2010) Transgenic plants for abiotic stress resistance. Kole C. et al. (eds.). In: *Transgenic Crop Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 67-132.

- Kacperska A. (1985) Biochemical and physiological aspects of frost hardening in herbaceous plants. In: *Plant production in the North*. Troms etc.: Norwegian Univ. press, pp. 99-115.
- Kartofel' Rossii: v 3-h t. (2005) Pod red. A.V. Kartashova. T.1. *Selekcija, semenovodstvo, sertifikacija*. M. 576 s. (in Russian).
- Keniya M.V., Lukash A.I., Gus'kov E.P. (1993) Role of low-molecular antioxidants under oxidative stress. *Usp. Sovrem. Biol.*, **113**, 456-470. (in Russian).
- Koch K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 509-540.
- Koch K.E. (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 235-246.
- Kolupaev Yu.V., Trunova T.I. (1992) Properties of metabolism and protective functions of plant carbohydrates under stress conditions. *Fiziol. Biokh. Kul't. Rast.*, **24**, 523-533. (in Russian).
- Krasavina M.S., Burmistrova N.A., Raldugina G.N. (2014) The role of carbohydrates in plant resistance to abiotic stresses. Ahmad P., Rasool S. (eds.). In: *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Elsevier Inc., **1**, pp. 229-270.
- Kreslavski V.D., Zorina A.A., Los D.A., Fomina I.R., Allakhverdiev S.I. (2013) Molecular mechanisms of stress resistance of photosynthetic machinery. In: *Molecular Stress Physiology of Plants*. Rout G.R., Das A.B. (eds.) Springer India, pp. 21-51.
- Kursanov A.L. (1984) Endogenous regulation of assimilate transport and source-sink relations in plants. *Fiziol. Rast.*, **31**, 579-594. (in Russian).
- Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B., Wood J.M. (1999) The dual action of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell*, **11**, 707-726.
- Lehninger A.L. (1982) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc.
- Levitt J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. V.1. Chilling, freezing and high temperature stresses. N.Y.: Acad. Press.
- Livingston D.P., Henson C.A. (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: Responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiol.*, **116**, 403-408.
- Maksimov N.A. (1952) *Izbrannye raboty po zasuhoustojchivosti i zimostojkosti rastenij*. T.2. *Zimostojkost' rastenij*. M.: Izd-vo AN SSSR. 295 s. (in Russian).
- Matros A., Peshev D., Peukert M., Mock H.P., Van den Ende W. (2015). Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof of concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **82(5)**, 822-839.
- Murayama S., Handa H. (2007) Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta*, **225**, 1193-1203.
- Nägele T., Kandel B.A., Frana S., Meissner M., Heyer A.G. (2011) A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.*

- 278, 506-518.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.*, **147**, 1251-1263.
- Popov V.N., Antipina O.V., Burakhanova E.A. (2013) Involvement of cell-wall invertase in low-temperature hardening of tobacco plants. *Rus. J. Plant Physiol.*, **60**, 221-226.
- Prasil I., Zamecnik J. (1998) The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. *Environ. and Exp. Bot.*, **40**, 1-10.
- Proels R.K., Hückelhoven R. (2014) Cell wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology*, **15**, 858-864.
- Roberts D.W.A. (1982) Changes in the of invertase during the development of wheat leaves growing in cold-hardening and nonhardening conditions. *Canad. J. Bot.*, **60**, 1-6.
- Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M., Proels R., Sinha A.K. (2003) Extracellular Invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.*, **54**, 513-524.
- Roitsch T., Gonzalez M-C. (2004) Function and regulation of plant invertase: sweet sensation. *Trends Plant Sci.*, **9**, 606-613.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 675-709.
- Rolland F., Sheen J. (2005) Sugar sensing and signaling networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 269-271.
- Ruan Y.-L. (2012) Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular Plant.*, **53**, 763-765.
- Sauer N. (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*, **581**, 2309-2317.
- Sinkevich M.S., Sabelnikova E.P., Deryabin A.N., Astakhova N.V., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Trunova T.I. (2008) The changes in invertase activity and the content of sugars in the course of adaptation of potato plants to hypothermia. *Russ. J. Plant Physiol.*, **55**, 449-454.
- Sherson S.M., Alford H.L., Forbes S.M., Wallac G., Smith S.M. (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **54**, 525-531.
- Smeeckens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 273-278.
- Sonnewald U., Hajlrezaei M.-R., Kossmann J., Heyer A., Thethewey R.N., Willmitzer L. (1997) Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnol.*, **15**, 794-797.
- Sonoike K. (1996) Photoinhibition of photosystem I – its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 239-247.
- Strauss G., Hauser H. (1986) Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2422-2426.
- Sum A.K., Faller R., de Pablo J.J. (2003) Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. *Biophysical J.*, **85**, 2830-2844.

- Tarkowski Ł.P., Van den Ende W. (2015) Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 203-220.
- Tjus S.E., Scheller H.V., Andersson B., Maller B.L. (2001) Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology*, **125**, 2007-2015.
- Trunova T.I. (2007) *Rastenie i nizektemperaturnyi stress (64-e Timiryazevskie chteniya)* (Plants and Cold Stress (64<sup>th</sup> Timiryazev Memorial Lectures)), Moscow: Nauka. (in Russian).
- Trunova T.I., Deryabin A.N., Sabel'nikova E.P., Alieva G.P., Aksenova N.P., Konstantinova T.N., Romanov G.A. (2001) Holodostojkost' rastenij kartofelja transformirovannogo genom drozhzhevoj invertazy. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*, **4**, 43-44. (in Russian).
- Trunova T.I., Astakhova N.V., Deryabin A.N., Sabelnikova E.P. (2003) Ultrastructural organization of chloroplasts of the leaves of potato plants transformed with the yeast invertase gene at normal and low temperature. *Dokl. Biol. Sc.*, **389**, 176-179.
- Turhan E., Ergin S. (2012) Soluble sugars and sucrose-metabolizing enzymes related to cold acclimation of sweet cherry cultivars grafted on different rootstocks. *Scientific World J.*, Article ID 979682.
- Thakur P., Nayyar H. (2013) Facing the cold stress by plants in the changing environment: sensing, signaling, and defending mechanisms. Tuteja N., Singh Gill S. (eds.). In: *Plant Acclimation to Environmental Stress*. Springer Science+Business Media New York, pp. 29-69.
- von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnewald U., Willmitzer L. (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.*, **9**, 3033-3044.
- Yuanyuan M., Zhang Y., Lu J., Shao H. (2009) Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African J. Biotechnology*, **8**, 2004-2010.