

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОГО РНК-СУПРЕССОРА ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ И ЗАСОЛЕНИЮ

©2013 А.Г. Комисаренко¹, С.И. Михальская¹, Л.Е. Сергеева¹, А.В. Кочетов², Е.Н. Тищенко¹

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

²Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Поступила 23.05.2013

Анализировали перспективность применения штамма *LB44404*, несущего рВи2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, созданным на основе гена *ProDH1* арабидопсиса, для повышения уровня устойчивости подсолнечника к водному дефициту и засолению. Используя летальные дозы стрессоров (0,4М маннита и 2,0% солей морской воды), показано повышение уровня свободного L-пролина в трансгенных регенерантах, выдерживающих стрессовое давление, и его снижение в период восстановления после стресса. Полученные данные свидетельствуют в пользу участия гена *ProDH* подсолнечника в процессах, связанных с осмотолерантностью.

Ключевые слова: подсолнечник (*Helianthus annuus* L.), осмотолерантность, двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы.

Перспективной методологией повышения уровня устойчивости растений к стрессам, вызванным водным дефицитом, является генетическая инженерия, одно из направлений которой связано с манипуляцией генами, принимающими участие в регуляции метаболизма L-пролина (Pro). Эта свободная аминокислота рассматривается, как осмолит, связанный с толерантностью к стрессам, и как фактор, имеющий отношение к процессам развития растений [1, 2].

Эндогенное содержание L-пролина в растительных клетках в норме и при стрессе координировано регулируется его синтезом, катаболизмом и транспортом [1]. Для повышения уровня накопления Pro главным образом исследуются возможности использования генов, контролирующих синтез белков скорость-лимитирующих энзимов его синтеза (пирролин-5-карбоксилатсинтетазу) и катаболизма (пролиндегидрогеназу, ProDH). Что касается генов *ProDH*, то частичную их супрессию можно осуществлять с применением векторных конструкций, созданных на основе чужеродных генов *ProDH*, расположенных в антисмысловой ориентации или в форме обращённого повтора. Считается, что использование siRNA –технологий является более эффективным [3, 4].

Гены *ProDH* клонированы для небольшого числа видов растений, их экспрессия преимущественно регулируется на транскрипционном уровне де- и регидратацией [1, 5].

Роль генов *ProDH* в процессах адаптации/устойчивости растений к разным абиотическим стрессам изучена у нескольких видов растений, при этом результаты исследований были не всегда однозначными. В связи с этим при разработке молекулярных биотехнологий очевидна целесообразность предварительного изучения их эффективности для повышения уровня стресс-устойчивости культурных растений. Что касается подсолнечника, то информация о генах катаболизма Pro и изменениях уровня их экспрессии методом генетической инженерии отсутствует. Цель данной работы состояла в анализе перспективности применения двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы, созданного на основе гена *ProDH1* арабидопсиса, для повышения уровня толерантности растений подсолнечника к водному дефициту и засолению.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил подсолнечник сорта Прометей (селекции Института масличных культур УААН) и инбредной линии 96A/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института УААН). Индукцию побегообразования *in vitro* из инокулированных эксплантов, а также интеграцию рекомбинантной молекулы ДНК в геном подсолнечника оценивали ПЦР-методом по наличию экзона, интрона гена *ProDH1* арабидопсиса и селективного *nr11*-гена так, как описано ранее [6, 7].

Agrobacterium-опосредованную трансформацию осуществляли с использованием штамма *LB44404*, содержащего бинарный вектор рВи2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса *ProDH1* (рис. 1).

Комисаренко Алла Григорьевна, м.н.с., e-mail: otyko@gmail.com; Михальская Светлана Ивановна, к.б.н., н.с., e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru; Сергеева Лариса Евгеньевна, к.б.н., с.н.с.; Кочетов Алексей Владимирович, к.б.н., зав. лабораторией, e-mail: ak@bionet.nsc.ru; Тищенко Елена Николаевна, д.б.н., зав. отделом, e-mail: otyko@gmail.com

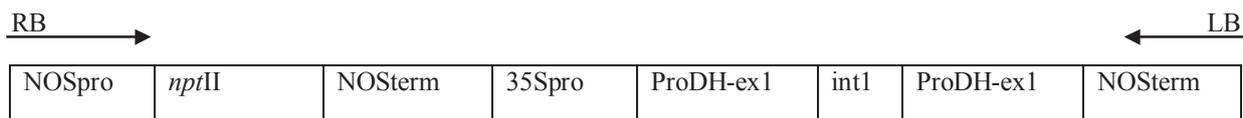


Рис. 1. Блок-схема Т-ДНК области pBi2E. NOSpro и 35Spro – соответственно промоторы гена нопаинсинтазы и 35S вируса мозаики цветной капусты; ProDH-ex1 и int1 – фрагменты первого экзона и интрона гена *ProDH1* арабидопсиса, соответственно; NOSterm – сигнал полиаденилирования гена нопаинсинтазы; *nptII* – ген неомидифосфотрансферазы *E. coli*, RB, LB – повторы, ограничивающие Т-область

Уровень свободного L-пролина определяли методом Чинарда с модификациями [8]. Для сравнительного анализа использовали регенеранты одного и того же возраста. Пробы отбирали и фиксировали в одно и то же время суток. Стрессовые условия создавали добавлением в среду культивирования маннита (0,4М) или солей морской воды (2,0%). Динамику изменения содержания свободного Pro в условиях стресса и в период восстановления после водного дефицита и сульфатно-хлоридного засоления определяли в листьях 1-го и 2-го ярусов побегов индивидуальных трансформантов. Контролем служило содержание L-пролина в листьях 7-суточных нетрансформированных регенерантов, культивируемых в условиях стресса. Статистическую обработку проводили по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ перспективности частичной супрессии генов пролиндегидрогеназы подсолнечника для по-

вышения уровня его осмотолерантности проводили в условиях *in vitro*, используя трансгенные регенеранты. Частота трансформации растений подсолнечника сорта Прометей и инбредной линии 96A/3, содержащих копию Т-ДНК, соответственно составляла 16,0% и 8,3%. Такие варианты рассматривались нами как предполагаемые трансформанты (Т0).

Предыдущие наши исследования показали, что индукция побегообразования подсолнечника на примере сорта Прометей осуществляется только из эксплантов, характеризующихся повышенным уровнем свободного L-пролина [8]. Это позволяет рассматривать данную аминокислоту как один из компонентов, участвующих в процессе органогенеза подсолнечника. В связи с этим, проводили сравнительные исследования содержания Pro в листьях Т0-побегов и трансформированных вариантов, в геном которых не был интегрирован трансген (рис. 2).

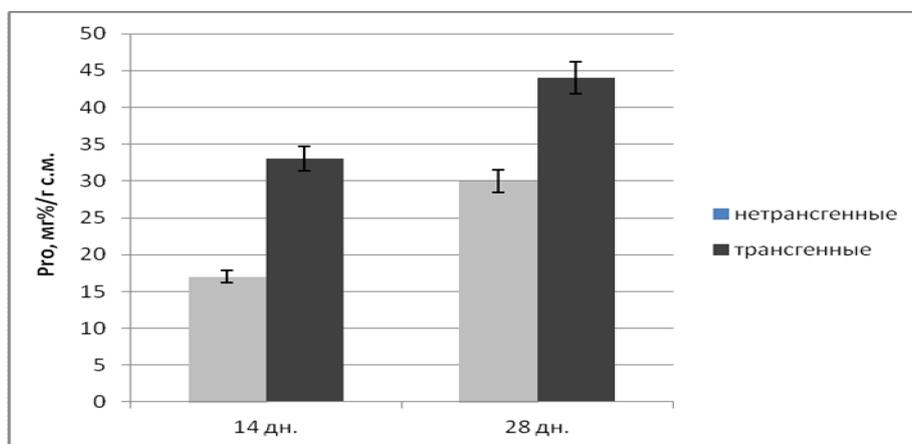


Рис. 2. Содержание свободного пролина в трансгенных и нетрансгенных растениях-регенерантах

Видно, что в нормальных условиях культивирования для трансгенных *Km*-устойчивых побегов в ходе их развития (14- и 28-суточные проростки) было характерно превышение (относительно контроля) уровня аккумуляции L-пролина, что возможно в случае уменьшения уровня транскрипции эндогенных генов пролиндегидрогеназы подсолнечника. Степень увеличения содержания пролина близка к показателю у трансформантов табака, несущих такую же конструкцию [2].

Известно, что ответная реакция растений на умеренные дозы стрессора сопровождается активацией транскрипции гена *P5CS* и снижением количества мРНК *ProPDH*, уровень которой возрастает

в период регидратации, то есть, после накопления *Pro* осуществляется его снижение во время восстановления после стресса. На первый план выступает сопряжённость событий: осмоустойчивость - метаболизм свободного L-пролина, координировано регулируемая генами его синтеза и катаболизма.

Поскольку в работе *Mani S.* и соавт. [5] отмечено отсутствие корреляции между экспрессией гена *ProPDH1* арабидопсиса, на основе которого создана используемая нами векторная конструкция, и осмоустойчивостью этого вида, анализ эффективности частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы подсолнечника проводили при летальных дозах стрессоров, моделирующих *in vitro* водный де-

фицит и сульфатно-хлоридное засоление. В условиях, когда происходит гибель всех контрольных растений, жизнеспособность предполагаемых трансформантов, сопряжённая с повышением уровня свободного L-пролина и его снижением в отсутствие стрессора, может осуществляться только при наличии функционального трансгена.

В связи с тем, что осмотический стресс имеет две разновидности – засоление и водный дефицит, имеющие свои особенности, рассматривали их действие и ответные реакции со стороны трансформантов отдельно. Изучение динамики накопления/убыли *Pro* подтвердило корректность такого подхода. На рис. 3 представлены результаты определения содержания свободного *Pro* в листьях трансгенных регенерантов подсолнечника инбредной линии 96А/3 и сорта Прометей, выдержавших селективное давление. Изменения в содержании пролина трансгенных вариантов оценивали относительно 7-суточного контроля, культивируемого в стрессовых условиях. Побеги контрольной группы погибли к концу второй недели.

С увеличением продолжительности моделированного водного дефицита содержание свободного *Pro* в клетках жизнеспособных трансформантов обоих изучаемых генотипов подсолнечника многократно возрастало аналогичным образом в течение короткого периода, тогда как в условиях восстановления после стресса уровень аминокислоты резко снижался (рис. 3, А, Б). При культивировании трансформантов в условиях летальных доз засоления также имело место увеличение уровня *Pro* и его снижение при возвращении к нормальным условиям (рис. 4, В, Г). В то же время наблюдались различия в ответной реакции на стрессовое воздействие у индивидуальных трансформантов. Тем не менее, система метаболизма свободного *Pro* у обоих генотипов, безусловно, активно функционировала. Одна из причин наблюдаемых различий могла быть обусловлена дифференциальной экспрессией генов катаболизма – синтеза, что, в частности, установлено для люцерны [9].

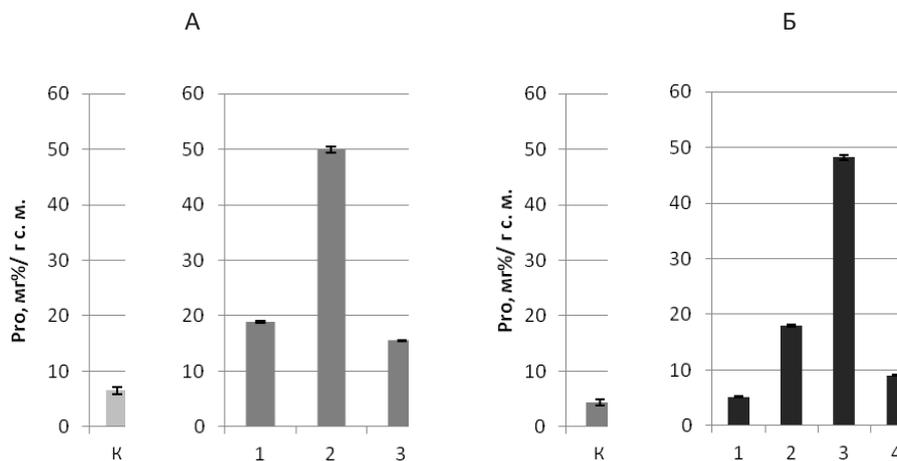


Рис. 3. Уровень свободного L-пролина в листьях трансформантов подсолнечника сорта Прометей (А) и инбредной линии 96-А/3 (Б) в условиях водного дефицита. К – контроль, нетрансгенные регенеранты. 1, 2 (А) и 1, 2, 3 (Б) индивидуальные трансформанты, культивируемые в течение 7, 14, 21 сут при стрессе, соответственно. 3 (А) и 4(Б) – трансформанты, культивируемые в период восстановления после стресса (21-е и 28-е сут, соответственно)

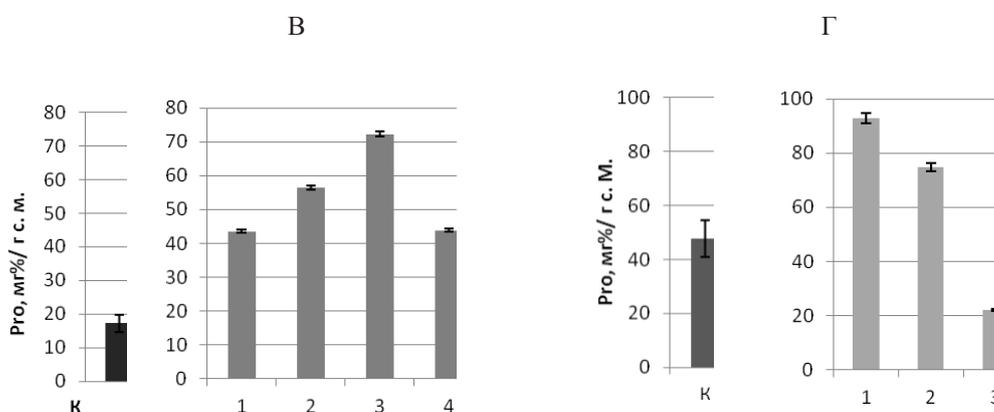


Рис. 4. Уровень свободного L-пролина в листьях трансформантов подсолнечника сорта Прометей (В) и инбредной линии 96-А/3 (Г) в условиях в сульфатно-хлоридного засоления. К – контроль, нетрансгенные регенеранты.

1, 2, 3 (В) и 1, 2 (Г) индивидуальные трансформанты, культивируемые в течение 7, 14, 21 сут при стрессе, соответственно. 4 (В) и 3(Г) – трансформанты, культивируемые в период восстановления после стресса (28-е и 21-е сут, соответственно)

Таким образом, стресс-устойчивость трансформантов к водному дефициту и сульфатно-хлоридному засолению сопровождалась повышением уровня свободного L-пролина и его снижением в период восстановления, что свидетельствует, во-первых, о функциональной значимости этой системы для данного объекта, и, во-вторых, о возможности использования частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы подсолнечника для получения стрессоустойчивых форм.

Работа поддержана грантом совместных научных проектов НАН Украины (16-05-2012) – СО РАН (№ 11).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szabados L, Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. 2009. V. 15. N 2. P. 89-97.
2. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 99-107.
3. Tateishi Y., Nakagama T., Esaka M. Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique // Physiologia Plantarum. 2005. V. 125. P. 1399-3054.
4. Тутов С.Е. Изучение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Новосибирск, 2008. 18 с.
5. Mani S., Van de Cotte B, Van Montagu M., Verbruggen N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis // Plant Physiology. 2002. V. 128. P. 73-83.
6. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // Биотехнология. 2010. Т. 3. № 4. С. 67-74.
7. Михальская С.И., Адаменко Н.И., Моргунов Б.В. и др. Компетентность к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сегментов побега элитных инбредных линий кукурузы // Биотехнология. 2012. Т. 5. № 3. С. 98-103.
8. Сергеева Л.Е., Комисаренко А.Г., Бронникова Л.И. и др. Содержание свободного пролина в тканях подсолнечника при реализации морфогенетического потенциала *in vitro* // Биотехнология. 2013. Т. 6. № 1. С. 113-118.
9. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate proline accumulation // Planta. 2005. V. 222. N 1. P. 70-79.

THE ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF DOUBLE-STRANDED RNA-SUPPRESSOR OF PROLINE DEHYDROGENASE GENE FOR ELEVATION OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) TOLERANCE TO WATER DEFICIT AND SALINITY

©2013 A.G. Komisarenko¹, S.I. Mykhalska¹, L.E. Sergeeva¹, A.V. Kochetov², E.N. Tishchenko¹

¹Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

²Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Perspective of using of strain LBA4404 harboring plasmid pBi2E with double-stranded RNA-suppressor, which was prepared on basis of Arabidopsis *ProDH1* gene, for the elevation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) tolerance to water deficit and salinity was estimated. The transgenic regenerants that maintained stress pressure of lethal doses of mannitol (0.4M) or sea water salts (2,0%) demonstrated the elevated level of free proline under stress conditions and its decline under recovery period. These data declare that *ProDH* gene confer the osmotolerance of sunflower.

Key words: sunflower (*Helianthus annuus* L.), osmotolerance, ds-RNA suppressor of proline dehydrogenase.

Alla Komisarenko, junior researcher, e-mail: oltyko@gmail.com; Svetlana Mykhalska, Candidate of Biology, researcher, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru; Larisa Sergeeva, Candidate of Biology, senior researcher; Alexey Kochetov, Candidate of Biology, associate prof., laboratory chief, e-mail: ak@bionet.nsc.ru; Elena Tishchenko, Doctor of Biology, department chief, e-mail: oltyko@gmail.com