

УДК 579.254.2

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *IN PLANTA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *LBA4404*, НЕСУЩЕГО *pBi2E* С ДВУХЦЕПОЧНЫМ РНК- СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

©2013 С.И. Михальская¹, А.Ю. Матвеева¹, 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

Получены трансгенные T1-растения кукурузы (*Zea mays* L.), содержащие двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы. Проанализирован уровень свободного L-пролина в побегах и корнях проростков в условиях сульфатно-хлоридного засоления. Показано, что стресс-устойчивость сопровождается повышением содержания этого осмолита.

Ключевые слова: *Zea mays* L., солеустойчивость, супрессор гена пролиндегидрогеназы, трансгенез.

Метаболическая инженерия предоставила новые возможности для решения проблемы устойчивости культурных растений к осмотическим стрессам. Одно из перспективных её направлений связано с генами, контролирующими метаболизм L-пролина (Pro). Генетические и физиолого-биохимические исследования показали, что L-пролин – полифункциональная аминокислота, которая может принимать участие в сложных интегральных процессах адаптации растений. Развивается также представление о Pro как о сигнальной/регуляторной молекуле в ходе роста, дифференцировки клеток и их программированной гибели [1-6]. Повышение уровня свободного L-пролина – физиологическая реакция многих видов растений в ответ на разные типы абиотических стрессов. Вместе с тем, роль Pro и его участие в процессах адаптации/устойчивости не всегда очевидна, о чём свидетельствуют результаты исследований уровня толерантности трансгенных растений и диких видов растений [2, 7-9].

Эндогенный уровень L-пролина растений в норме и при стрессе координировано регулируется его синтезом, катаболизмом и транспортом [10, 1, 2]. Гены, контролирующие метаболизм Pro, кодируются ядерным геномом, и наиболее детально исследованы у арабидопсиса и табака. Проанализированные на сегодняшний день гены синтеза – *P5CS* (энзим Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтаза, ЕС.2.7.2.11.1.2.1.41) и катаболизма – *ProDH* (энзим пролиндегидрогеназа, ЕС.1.5.99.8.) ряда растений находятся в центре внимания при разработке молекулярных биотехнологий, направленных на повышение уровня стрессоустойчивости культурных

растений. Они представлены единичными копиями с высоким уровнем гомологии, каждая из которых может выполнять различные функции, связанные с ответной реакцией на стресс и/или с пролиферацией, дифференцировкой клеток растений [11, 1, 2]. В связи с чем целесообразен предварительный анализ эффективности их применения для получения биотехнологических продуктов.

Что касается *ProDH*, то для повышения уровня свободного пролина исследуются возможности частичной супрессии генов, контролирующих катаболизм L-пролина, с использованием векторных конструкций, создаваемых на основе чужеродных генов пролиндегидрогеназы, расположенных в антисмысловой ориентации или в форме обращённого повтора. При этом есть основания полагать, что применение siRNA –технологий является более эффективным [5, 6, 12, 13].

Целью данной работы был анализ содержания L-пролина в проростках кукурузы, трансформированной *in planta* с использованием обезоруженного агробактериального штамма *LBA4404*, содержащего плазмиду с двухцепочечным (дц)РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, в условиях стресса, вызванного сульфатно-хлоридным засолением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила инбредная линия кукурузы 250 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины), трансформированная *in planta* с использованием обезоруженного агробактериального штамма *LBA4404*, несущего бинарный вектор *pBi2E* с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса *ProDH1* (рис. 1).

Присутствие трансгена в геноме кукурузы анализировали ПЦР-методом так, как описано ранее [14].

Михальская Светлана Ивановна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru; Матвеева Александра Юрьевна, к.б.н., младший научный сотрудник, e-mail: mgigais@mail.ru; Сергеева Лариса Евгеньевна, к.б.н., старший научный сотрудник; Кочетов Алексей Владимирович, к.б.н., заведующий лабораторией, e-mail: ak@bionet.nsc.ru; Тищенко Елена Николаевна, д.б.н., заведующая отделом, e-mail: otyuko@gmail.com

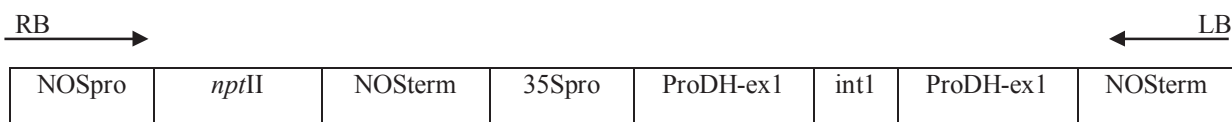


Рис. 1. Блок-схема Т-ДНК области pBi2E. NOSpro и 35Spro – соответственно промоторы гена нопалинсинтазы и 35S вируса мозаики цветной капусты; ProDH-ex1 и int1 - фрагменты первого экзона и интрона гена *ProDH1* арабидопсиса, соответственно; NOSterm – сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы; *nptII*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

Уровень свободного L-пролина (Pro) определяли методом Чинарда с модификациями [15]. Для сравнительного анализа использовали 14-, 18- и 21-суточные проростки. Пробы отбирали и фиксировали в одно и то же время суток. Стрессовые условия создавали добавлением в среду культивирования летальные дозы солей морской воды (2,0% и 2,5%). Стрессовому воздействию подвергали 7-суточные проростки, выращенные в нормальных условиях (1 вариант), и зерновки, проращиваемые и культивируемые в стрессовых условиях в течение 28 дней (2 вариант). Содержания Pro определяли в корнях и побегах 18-суточных трансгенных проростков, полученных при проращивании зерновок (по 8 штук), взятых из 6-ти разных початков. Контролем служили побеги или корни нетрансгенных вариантов в нормальных/стрессовых условиях. При статистической обработке использовали критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для углубления представления о роли генов *ProDH* в процессах адаптации и жизнедеятельности кукурузы исследовали содержание свободного L-пролина в проростках кукурузы, трансформированной *in planta* с применением LBA4404, несущего

плазмиду с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, в условиях засоления, приводившего к гибели контрольных (нетрансгенных) вариантов. Параллельно, такой подход позволяет проанализировать эффективность частичной супрессии генов *ProDH* кукурузы с использованием siRNA-технологий.

На рис. 2 представлены результаты содержания свободного Pro в побегах проростков, адаптированных к засолению (общий возраст проростков 14 суток, вариант 1). Видно, что уровень этой аминокислоты у ряда индивидуальных трансгенных вариантов варьировал, однако по абсолютной величине, за исключением трёх случаев, существенно превышал содержание Pro в проростках контрольных побегов. По-видимому, в вариантах V, VI и XI трансген был нефункциональным или уровень его транскрипции был незначительным. Полученные данные дают основание предполагать, что эта аминокислота выступает в качестве протектора при адаптации к ионному стрессу. Отметим, что повышение уровня свободного пролина у трансгенных растений кукурузы, содержащих антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы, на фоне хлоридного засоления ранее показано Моисеевой Е.М. и соавт. [15].

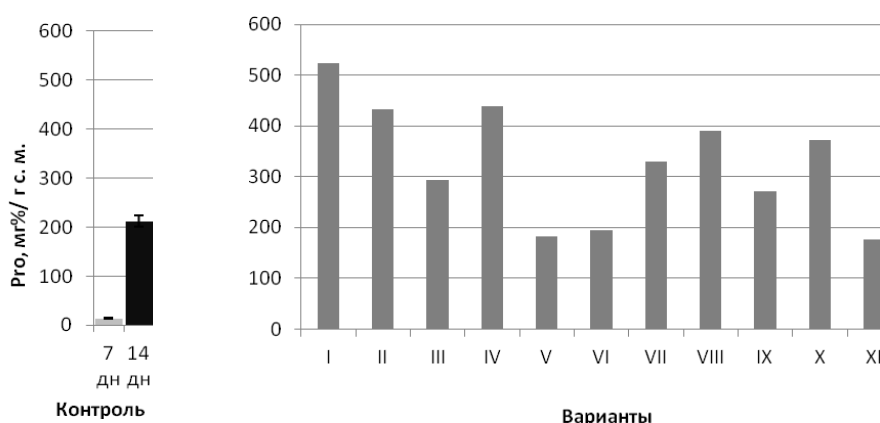


Рис. 2. Содержание свободного L-пролина в побегах адаптировавшихся к сульфатно-хлоридному засолению (2,0% солей морской воды) 14-суточных проростков кукурузы (1 – XI). Контроль: 7 сут в нормальных условиях и через 7 сут в условиях стресса

Зерновки трансгенных растений кукурузы характеризовались также способностью к прорастанию в условиях постоянного действия стрессового фактора (вариант 2). Их проращивали сначала на фоне 2,0% засоления (летальная доза стрессора), затем 7-суточные проростки переносили в более жёсткие условия стресса (2,5% солей морской во-

ды) и культивировали ещё 2 недели. Рис. 3 отображает содержание свободного пролина в 21-суточных проростках. Видно, что в условиях стресса уровень Pro существенно превышал показатель контроля. Это свидетельствует в пользу того, что этот осмолит является одним из факторов, принимающих участие в поддержании жизнедеятельно-

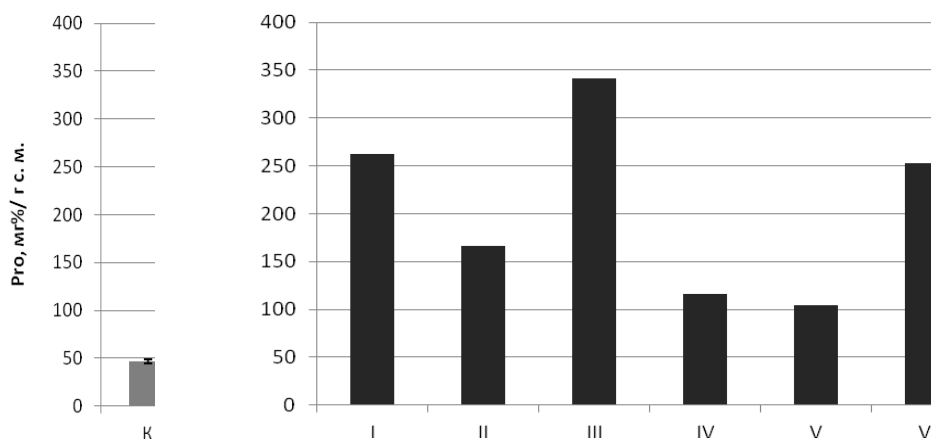


Рис. 3. Содержание свободного L-пролина в побегах 21-суточных проростков, культивируемых в условиях возрастающего сульфатно-хлоридного засоления (последовательно 2,0% и 2,5% солей морской воды). К – побеги нетрансгенных 7-суточных проростков в условиях стресса (2,0% солей морской воды)

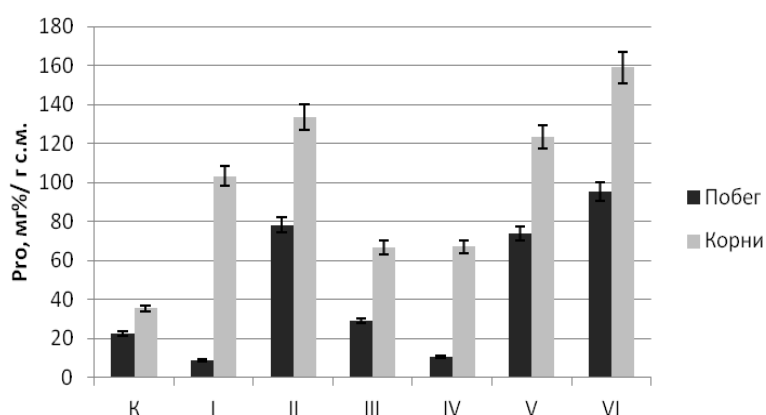


Рис. 4. Содержание свободного L-пролина в корнях и побегах 18-суточных трансгенных проростков, которые культивировались в условиях постоянного действия сульфатно-хлоридного засоления (2,5% солей морской воды). К – побеги трансгенных проростков в отсутствие стресса

сти кукурузы в стрессовых условиях. Очевидно, что уровень свободного пролина является результатом координированного функционирования системы синтеза – катаболизма.

Сравнительное изучение содержания свободного Pro в побегах и в корнях 18-суточных трансгенных проростков показало, что уровень его накопления в корнях превышал этот показатель в побегах, как в норме, так и в условиях стресса (рис. 4). Наблюдаемые различия в нормальных условиях культивирования трансгенных проростков свидетельствуют о тканеспецифичности аккумуляции этой аминокислоты. Следует отметить, что в контрольных вариантах (дикий тип) уже на 14-й день опыта содержание пролина составляло в побегах ($138,66 \pm 30,41$ мг%/г с.м.), корнях ($146,63 \pm 19,86$ мг%/г с.м.) и достоверно не различалось. Далее продолжалась прогрессирующая гибель контроля. Высокие показатели уровня пролина в данном случае, очевидно, являлись отражением деградации пролин-содержащих компартментов клеток. Эти результаты согласуются с литературными данными [16, 17]. При летальных дозах сульфатно-хлоридного засоления у трансформантов по сравнению с контролем (трансгенные проростки) про-

исходило существенное увеличение содержания свободного пролина. Большой уровень аккумуляции этой аминокислоты в корнях, возможно, являлся отражением депонирования токсичных ионов.

Таким образом, солеустойчивость трансформантов, содержащих двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы кукурузы, сопровождался аккумуляцией свободного L-пролина.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // *Current Sci.* 2005. V. 88. N 3. P. 424-438.
2. Szabados L, Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in plant science.* 2009. V.15. N 2. P. 89- 97.
3. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? // *The Plant Journal.* 2002. V. 3. N 16. P. 699-712.
4. Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms // *Plant Signal Behav.* 2011. V. 6. N 8. P. 1195-1197.

5. Кочетов А.В., Тутов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 282-285.
6. 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.
7. 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.
8. Kaplan F., Kopka J., Sung DY et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content // Plant J. 2007. V. 50. P. 967-981.
9. Sharma S., Villamor J. G., P. E. Verslues. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential // Plant Physiology. 2011. V. 157. P. 292-304.
10. Peng Z., Lu Q., Verna D.P. Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants // Mol. Gen. Genet. 1996. N 3. P. 334-341.
11. 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.
12. Тутов С.Е. Изучение генетически модифицированных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы: Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. Новосибирск, 2008. 16 с.
13. 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. 125. P.1399-3054.
14. 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.
15. 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.
16. Мусеева Е.М., Агапов Д.А., Вешков В.А. и др. Повышение содержания пролина в растениях кукурузы, экспрессирующих фрагмент гена пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 457-460.
17. 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.
18. Battaglia M., Solorzanlo R.M., Hernandez P. et al. Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings // Planta. 2007. V. 225. P. 1121-1133.
19. Goo J.N., Park A.R., Park W.J., Park O.K. Selection of Arabidopsis genes encoding and secreted plasma membrane proteins // Plant Mol. Biol. 1999. V. 41. P. 415-423.

INVESTIGATION OF THE FREE PROLINE CONTENTS IN CORN PLANTS TRANSFORMED IN PLANTA USING LBA4404, HARBORING pBi2E WITH DOUBLE-STRANDED RNA-SUPPRESSOR PROLINE DEHYDROGENASE

©2013 S.I. Mykhalska¹, A.Y. Matveeva¹, L.E. Sergeeva¹, A.V. Kochetov², E.N. Tishchenko¹

¹ Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

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

The transgenic corn T1-plants (*Zea mays* L.) with double-stranded RNA-suppressor proline dehydrogenase were obtained. The levels of free L-proline in shoots and roots under sulfate-chloride salinity were estimated. There was shown that corn salt tolerance was conferred by elevated level of this osmolyte.

Key words: *Zea mays* L, salt tolerance, proline dehydrogenase gene suppression, transgene plant.

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