

УДК 577.21

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

А.Г. КОМИСАРЕНКО, С.И. МИХАЛЬСКАЯ, В.М. КУРЧИЙ, С.К. СЫТНИК,
Л.Е. СЕРГЕЕВА, Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с использованием штамма *LB4404*, содержащего плазмиду *pVi2E* с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, получено семенное Т2-поколение трансгенных растений подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), которое выдерживало при проращивании моделированный маннитом летальный для обычных растений осмотический стресс. При выращивании растений Т3-поколения в условиях почвенной засухи выявлено повышение уровней свободного пролина, хлорофилла, каротиноидов, улучшение параметров ФС II в листьях трансгенных растений по сравнению с нетрансформированными. Полученные данные подтвердили перспективность siРНК-технологий для повышения устойчивости подсолнечника к водному дефициту.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., пролин, двухцепочечный РНК-супрессор *ProDH*, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta*.

Одно из перспективных направлений генетической инженерии связано с повышением уровня устойчивости культурных растений, в том числе и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), к осмотическим стрессам. Для генетического улучшения дву- и однодольных используются разные стратегии, особое внимание уделяется генам, контролирующим метаболизм *L*-пролина (Pro). Эта свободная аминокислота рассматривается и как осмотически активное вещество, связанное с толерантностью к стрессам, и как фактор, принимающий участие в процессах развития растений [11, 12, 17].

Ключевую роль в контроле уровня пролина играет реципрокная регуляция генов синтеза — Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтетазы *P5CS*, а также катаболизма — пролиндегидрогеназы *ProDH* [15]. Что касается гена *ProDH*, то его роль и целесообразность использования в молекулярных биотехнологиях по повышению стресс-устойчивости растений, является предметом исследований. Информация по этому вопросу с применением смысловых и антисмысловых стратегий имеется для узкого круга культурных растений [2, 4, 5, 13, 14]. Более того, результаты исследований для разных стрессоров не всегда однозначны [13, 14], а данные, касающиеся siРНК-технологий, крайне ограничены [5, 7, 9, 18]. Ранее нами получены растения-регенеранты подсолнечника, несущие двухцепочечный РНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы (дцРНК-су-

прессор гена *ProDH*), и показано, что их устойчивость к летальному обезвоживанию и летальным дозам сульфатно-хлоридного засоления сопряжена с активным метаболизмом *L*-пролина [6]. Более того, разработанным нами способом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* получены трансгенные растения с дцРНК-супрессором гена *ProDH* и их семенное поколение [8].

Целью данной работы был физиолого-биохимический анализ Т3-поколения трансгенных линий подсолнечника (*H. annuus* L.) с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы.

Методика

Объектом исследования служили трансгенные линии подсолнечника, полученные путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* инбредной линии подсолнечника VK-121 (селекции Института масличных культур НААН Украины, Запорожская обл., п. Солнечный), любезно предоставленной д-ром биол. наук В.А. Ляхом.

Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили штаммом *LB44404*, содержащим бинарный вектор *pBi2E* с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса *ProDH1* [6, 8]. Этот штамм любезно предоставлен канд. биол. наук А.В. Кочетовым (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск).

Молекулярно-генетический анализ на наличие экзона и интрона гена пролиндегидрогеназы определяли так, как описано ранее [6]. При этом отсутствие агробактериальной примеси в трансгенных растениях анализировали по гену *virC*.

Уровень устойчивости трансгенных растений Т2-поколения определяли в условиях летального обезвоживания поэтапно: сначала при 0,5 М, потом 0,8 М маннита.

Семена трансгенных растений Т3-поколения проращивали в вегетационном опыте при нормальных условиях культивирования в течение 14 сут, затем часть проростков продолжали культивировать в тех же условиях еще 14 сут, а вторую их часть культивировали 2 недели при отсутствии полива. После этого полив возобновляли до нормального и определяли ряд физиолого-биохимических показателей: содержание свободного *L*-пролина, хлорофилла — в одном листе первой пары листьев, а ряд параметров ФС II — в другом ее листе.

Уровень свободного *L*-пролина в листьях определяли по стандартной методике [1]. Пробы отбирали и фиксировали в одно и то же время суток. Динамику содержания свободного Pro в условиях стресса и в период восстановления после стресса определяли в листе каждого индивидуально развивающегося растения. В качестве контроля принимали содержание *L*-пролина в листьях нетрансформированных вариантов, культивируемых в условиях стресса и (или) в нормальных условиях. Параметры ФС II (квантовый выход ФС II, фотохимическое тушение, квантовый выход транспорта электронов) определяли на РАМ флуориметре FL2LP (Qubit system Inc., Канада) согласно формулам, предложенным Корнеевым [3], содержание хлорофиллов (*a*, *b*) и каротиноидов — по Велбурну [19]. При статистической обработке результатов исследований (6 биологических повторов) применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* получено семенное поколение трансгенных растений подсолнечника с дцРНК-супрессором гена *ProDH*. На рис. 1 представлены результаты молеку-

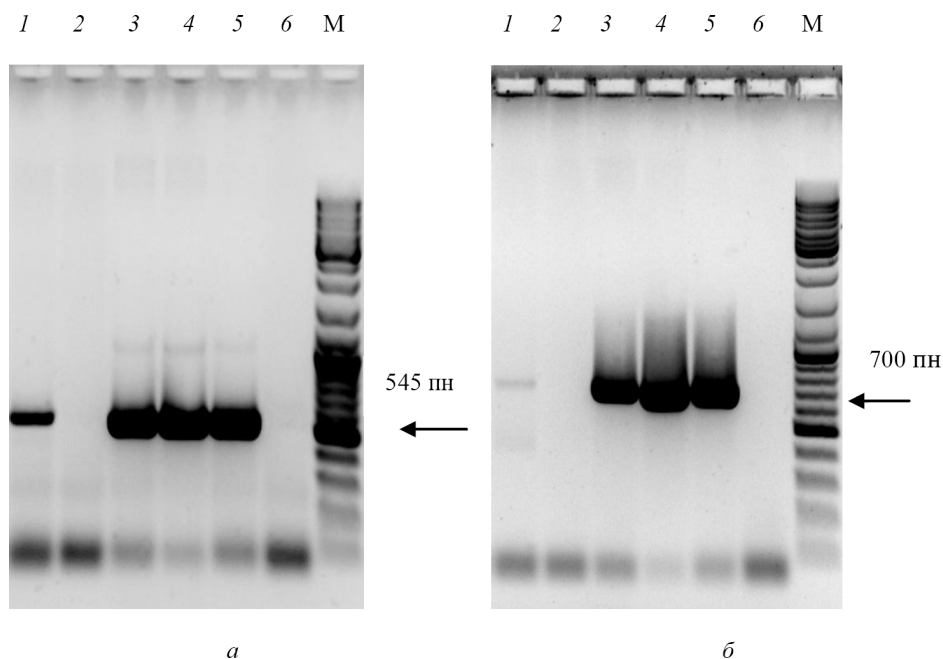


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК листьев Т2-поколения растений инбредной линии К-121 подсолнечника с использованием праймеров к первому экзону (а) — 545 пн и интрону (б) — 700 пн гена *ProDH1* арабидопсиса:

1, 3, 4 — листья *Km*-устойчивых проростков; 2 — листья *Km*-неустойчивого проростка; 5 — позитивный контроль — ДНК обезоруженного штамма *LB44404*; 6 — негативный контроль (без ДНК); М — маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

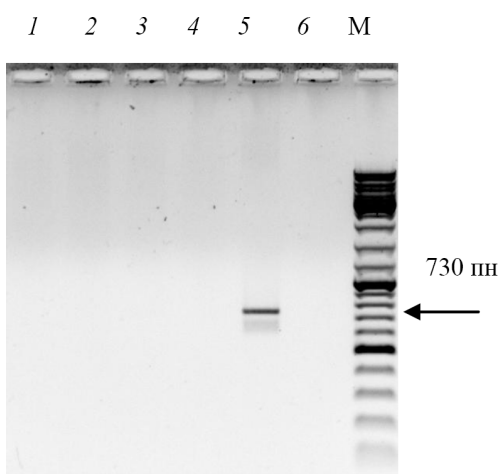


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК листьев Т2-поколения растений инбредной линии VK-121 подсолнечника с использованием праймеров к гену *virC*:

1—4 — *Km*-устойчивые проростки Т2-поколения растений инбредной линии VK-121, трансформированной *in planta*; 5 — позитивный контроль — ДНК штамма *LB44404*; 6 — негативный контроль (без ДНК); М — маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

лярно-генетического анализа Т2-поколения трансгенных растений подсолнечника, в которых показано наличие экзона и интрона гена пролиндегидрогеназы. При этом отсутствие агробактериальной примеси в трансгенных растениях определено по гену *virC* (рис. 2).

Отбор стрессоустойчивых вариантов Т2-поколения проводили в условиях моделированного летального обезвоживания поэтапно: сначала растения культивировали с применением 0,5 М маннита, потом увеличи-

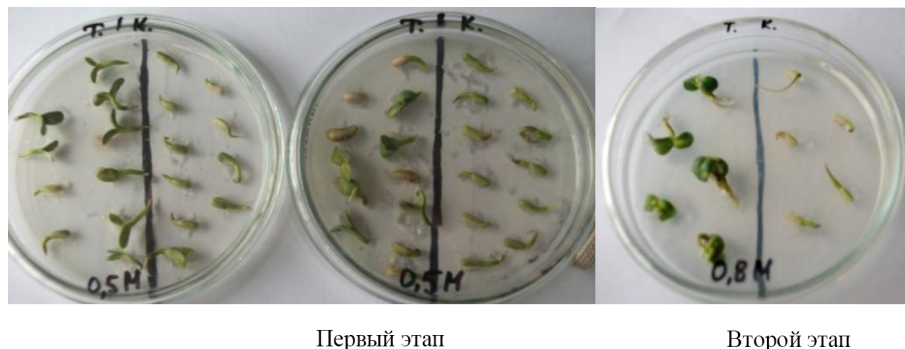


Рис. 3. Этапы отбора трансформантов подсолнечника на селективной концентрации маннита:

первый этап — 0,5 М; второй этап — 0,8 М

вали стрессовое давление до 0,8 М маннита. Как видно из данных, представленных на рис. 3, трансгенные растения подсолнечника с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы (Т2-поколение), выдержавшие летальное обезвоживание, оставались жизнеспособными, тогда как контрольные нетрансформированные растения погибали на раннем этапе прорастания.

При выращивании в вегетационном опыте растений Т3-поколения (полученных из семян растений Т2-поколения) на ранних этапах роста и развития наблюдались динамичные изменения содержания пролина в условиях норма → стресс → норма (рис. 4). Уровень этой аминокислоты в нормальных условиях культивирования трансгенных растений достоверно превосходил таковой контроля (линия VK-121). В условиях стресса (отсутствие полива в течение 14 сут) наблюдалась такая же динамика, однако контрольные растения отставали в росте и развитии. Следует от-

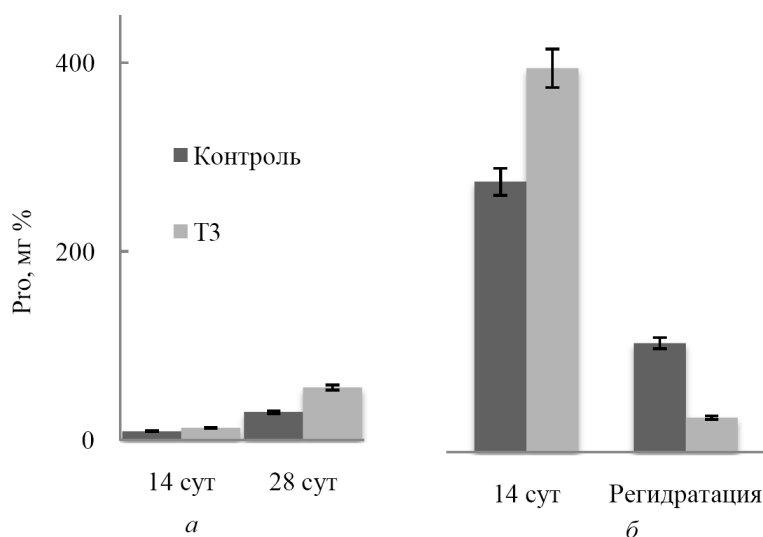


Рис. 4. Содержание свободного пролина в листьях трансформантов Т3-поколения инбредной линии подсолнечника VK-121 в норме, в условиях почвенной засухи и после возобновления полива:

а — норма; б — стресс—восстановление

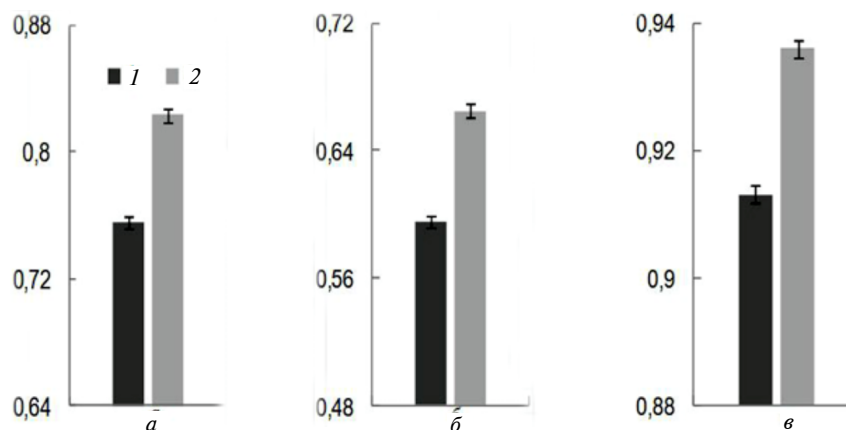


Рис. 5. Параметры ФС II в листьях подсолнечника (первая пара) после двухнедельной почвенной засухи:

a — квантовый выход ФС II; *b* — квантовый выход транспорта электронов; *v* — фотохимическое тушение; 1 — контроль; 2 — Т3

метить, что при водном дефиците содержание пролина относительно нормальных условий выращивания повышалось приблизительно в 15—20 раз. При этом в вариантах трансгенных растений его уровень в ~1,3 раза превышал контрольный. При регидратации (в течение 3 ч) содержание P_{700} в обоих вариантах резко снижалось, причем в трансгенных растениях оно было на уровне контроля в нормальных условиях. Это свидетельствует о быстрой реакции на изменяющиеся условия окружающей среды, причем в трансгенных растениях процесс восстановления после стресса происходил значительно быстрее, чем в контрольных.

Анализ ФС II, которая является более чувствительной к стрессовым воздействиям, чем ФС I, показал, что квантовый выход ФС II в трансгенных растениях в среднем составляет 0,82, тогда как в контрольном варианте он был ниже 0,76 (рис. 5, *a*). Известно, что для растений, находящихся в оптимальных условиях, этот параметр приближается к 0,83; он также является весьма чувствительным к разнообразным стрессовым влияниям, которые вызывают его понижение. В данном случае видно, что водный дефицит приводил к снижению квантового выхода ФС II исключительно у контрольных растений.

На рис. 5, *b*, *v* представлены сравнительные результаты измерений фотохимического тушения и квантового выхода транспорта электронов для контрольных и трансгенных растений после двухнедельного водного дефицита. Оба параметра оказались существенно ниже у контрольных растений. Таким образом, изменения параметров ФС II, отражающих функциональное состояние фотосинтетического аппарата и растения в целом, указали на отсутствие стрессового воздействия на трансгенные растения.

Что касается содержания хлорофиллов *a*, *b*, *a + b* и каротиноидов (таблица), между трансгенными и контрольными растениями наблюдались различия. По всем этим показателям трансгенные растения превышали контрольные.

Следует отметить, что в ряде исследований трансгенных растений с использованием генов транскрипционных факторов и структурных генов показаны изменения параметров фотосинтеза. В частности, в трансгенных растениях кукурузы, конститутивно экспрессирующих ген *cspB*, в условиях водного дефицита отмечено повышение фотосинтетической

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Содержание хлорофилла и каротиноидов в листьях растений подсолнечника ($\text{мг}/\text{дм}^2$), подвергнутых почвенной засухе

Вариант	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>a + b</i>	Каротиноиды
Контрольные растения	2,08±0,01	0,88±0,01	2,96±0,1	0,22±0,01
Трансгенные растения	2,72±0,05	1,10±0,02	3,82±0,3	0,27±0,02

активности и содержания хлорофилла [10]. В трансгенных растениях арабидопсиса, конститутивно экспрессирующих ген пшеницы *TaSnRK2.7*, отмечено повышение активности ФС II [20], в трансгенных растениях риса, несущих ген *TaSTRG*, увеличивалось содержание хлорофилла [21]. В трансгенных растениях табака (M51-1), конститутивно сверхэкспрессирующего модифицированный ген *P5CSF129A*, аккумуляровался свободный *L*-пролин, повышались эффективность использования воды, содержание хлорофилла и пигментов ксантофилльного цикла. При этом дефицит влаги приводил к снижению всех параметров газообмена и содержания хлорофилла, однако увеличивалось количество пигментов ксантофилльного цикла [16].

Таким образом, физиолого-биохимический анализ Т3-поколения трансгенных растений подсолнечника показал повышение содержания свободного пролина в норме и при водном дефиците. Осмотолерантные трансгенные растения имели улучшенные показатели ФС II, а также повышенное содержание хлорофилла и каротиноидов в нормальных условиях культивирования.

1. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tourn* // Изв. АН МССР. — 1981. — 4. — С. 55—60.
2. Ибрагимова Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль гена пролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений // Физиология растений. — 2012. — 59. — С. 99—107.
3. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. — Киев: Альтерпрес, 2002. — С.
4. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих бессмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. — 2004. — 40, № 2. — С. 282—285.
5. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю. и др. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных трансгенных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Физиология растений и генетика. — 2014. — 46, № 6. — С. 482—489.
6. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма *L*-пролина для повышения осмотолерантности растений // Там же. — 2013. — 45, № 1. — С. 489—500.
7. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И. и др. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма *LVA4404*, несущего плазмиду pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Цитология и генетика. — 2014. — 48, № 4. — С. 19—30.
8. Патент на корисну модель № 86108 від 10.12.2013 А.Г. Комисаренко, С.І. Михальська, О.М. Тищенко / Спосіб застосування *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* для отримання трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.).
9. Borsani O., Zhu J., Verslues E.P. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis* // Cell. — 2005. — 123. — P. 1279—1291.
10. Castiglioni P., Warner D., Bensen R.J. et al. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions // Plant Physiol. — 2008. — 147. — P. 446—455.
11. 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 // Curr. Sci. — 2005. — 88, N 3. — P. 424—438.

12. Maggio A., Miyazaki S., Veronese P. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? // Plant J. — 2002. — 3, N 16. — P. 699–712.
13. 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 Physiol. — 2002. — 128. — P. 73–83.
14. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y. et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in Arabidopsis thaliana // FEBS Lett. — 1999. — 461. — P. 205–210.
15. 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.
16. Pospisilova J., Haisel D., Vankova R. Responses of transgenic tobacco plants with increased proline content to drought and/or heat stress // AJPS. — 2011. — 2, N 3. — P. 318–324.
17. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. — 2009. — 15, N 2. — P. 89–97.
18. 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 // Physiol. Plant. — 2005. — 125. — P. 224–234.
19. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // Plant Physiol. — 1994. — 144. — P. 307–313.
20. Zhang H., Mao X., Jing R. et al. Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) TaSnRK2.7 gene involved in abiotic stress responses // J. Exp. Bot. — 2011. — 62, N 3. — P. 975–988.
21. Zhou W., Li Y., Zhao B.C. et al. Overexpression of TaSTRG gene improves salt and drought tolerance in rice // J. Plant Physiol. — 2009. — 166, N 15. — P. 1660–1671.

Получено 27.02.2015

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН СОНЯШНИКА З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК-СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

А.Г. Комисаренко, С.І. Михальська, В.М. Курчій, С.К. Ситник, Л.Є. Сергеева, О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta з використанням штаму LBA4404, що містить плазмиду pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, отримано насіннєве Т2-покоління трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.), яке витримувало при пророщуванні модельований манітолом летальний для звичайних рослин осмотичний стрес. При вирощуванні рослин Т3-покоління в умовах ґрунтової посухи виявлено підвищення рівнів вільного проліну, хлорофілу, каротиноїдів, поліпшення параметрів ФС II в листках трансгенних рослин порівняно з нетрансформованими. Отримані дані підтвердили перспективність siРНК-технологій для підвищення стійкості соняшника до водного дефіциту.

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF TRANSGENIC SUNFLOWER PLANTS WITH dsRNA SUPPRESSOR OF PROLINE DEHYDROGENASE GENE

A.G. Komisarenko, S.I. Mykhalska, V.M. Kurchii, S.K. Sytnyk, L.E. Sergeeva, O.M. Tishchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The T2-transgenic sunflower plants (*Helianthus annuus* L.) were obtained via in planta *Agrobacterium*-mediated transformation by LBA4404 harboring pBi2E with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. Their seedlings were survived under lethal water deficit simulating by mannitol. In T3-plants grown under conditions of soil drought high levels of free proline, chlorophyll, carotenoids and improvement of indices of photosystem II in leaves were revealed compared to wild type. Those data indicate the promising scope of siRNA technologies for sunflower improvement towards water deficit tolerance.

Key words: *Helianthus annuus* L., proline, dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene, *Agrobacterium*-mediated transformation in planta.