

DNA excision method mediated by the Cre/loxP recombination system was developed to produce marker-free transgenic plants without conditional treatment or the genetic crossing of offspring. Present study demonstrates that the novel site-specific recombinase Cre/loxP system provides a simple and efficient way to generate marker-free transgenic plants.

Key words: genetically modified plants, site-specific recombinase system, transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, PCR analysis, GUS test.

УДК 579.254.2

СЕРГЕЕВА Л.Е., МИХАЛЬСКАЯ С.И., КУРЧИЙ В.М., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Україна, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЯ В СОДЕРЖАНИИ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПОБЕГАХ И КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Осмотические стрессы окружающей среды (засоление и водный дефицит) оказывают негативное влияние на рост, развитие сельскохозяйственных культур и их продуктивность. Характерной чертой этих стрессов является продолжительность их воздействия, в случае же засоления речь идёт о постоянном действии стрессового фактора. Вместе с тем в природе существуют дикие виды, а также генотипы культурных растений, отличающиеся повышенным уровнем стресс-устойчивости. Очевидно, что выживание таких растений в критических условиях сопряжено со стабилизацией осмотического и ионного гомеостазов [1–3].

Для компенсации нарушений, вызываемых осмотическими стрессами, растения выработали ряд специальных механизмов, среди которых приоритетную роль играет свободный пролин (*Pro*). *Pro* нередко в больших количествах аккумулируется в растениях в ответ на водный дефицит и засоление. Широко обсуждается его роль как регулятора внутриклеточного осмотического потенциала, стабилизатора клеточных структур и бимополимеров, отмечается участие *Pro* в преодолении оксидативного стресса, а также в процессах восстановления, реабилитации и развития [4–7]. Свойства пролина таковы, что эта аминокислота может оказывать влияние на активность системы своего синтеза/катаболизма/транспорта. Очевидно, что уровень свободного *Pro* в тканях растения в значительной степени отражает эти события.

Ранее нами анализировался уровень аккумуляции свободного пролина в клетках растений, подвергавшихся продолжительным

осмотическим стрессам [8]. В этом случае содержание *Pro* было сопряжено со стабилизацией (поддержанием) процессов жизнедеятельности. Вместе с тем, эффективность выживания в неблагоприятных условиях обеспечивается и скоростью включения/активизации защитных механизмов. В связи с этим встаёт вопрос о характере изменений в содержании свободного пролина в начале стрессового воздействия, что даёт понимание «быстрых» ответных реакций организма. Немаловажное значение при этом имеет выяснение роли ключевых генов синтеза/катаболизма *Pro*. Удобной моделью для таких исследований являются трансгенные растения, в которых изменён уровень экспрессии ключевых генов, контролирующих метаболизм пролина – Д-пирролин-5-карбоксилатсинтазы и пролиндегидрогеназы. Исходя из этого, на начальных этапах воздействия моделированного летального засоления и обезвоживания проводили сравнительное изучение содержания свободного пролина в проростках исходной и трансформированной инбредной линии (Т0), полученной с использованием агробактериального штамма LBA4404, несущего pBi2E с двуцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы.

Материалы и методы

Объектами исследования были 7-ми суточные проростки инбредной линии кукурузы ЛЗ90, селекции ИФРГ НАН Украины, г.Киев, (контроль) и этой линии, трансформированной *in planta* с использованием LBA4404 (pBi2E с дц-РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы). Рекомбинатный штамм любезно

предоставлен Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики СО РАН).

Зерновки проращивали на воде в течение 7 суток в условиях 16-ти часового фотопериода. Стандартизированные по размеру проростки переносили в условия моделированного летального засоления (25,0 г/л солей морской воды) или обезвоживания (0,8 М маннита) и далее подвергали стрессу в течение 4 часов. Использовали водные растворы обоих веществ, поэтому нормальными условиями (н.у.) считали пребывание контрольных и Т0-проростков на воде. Содержание свободного пролина методом Чинарда в модификации [9] определяли в побегах и корнях проростков. При обработке результатов сравнительного исследования использовали критерий Стьюдента. Биологическая повторность опыта не менее чем четырёхкратная, аналитическая – двукратная.

Результаты и обсуждение

У исследуемых проростков кукурузы, культивируемых в течение 4-х часов в условиях действия летальных осмотических стрессов, визуальных патологий в состоянии растений не наблюдали. В то же время происходили изменения уровня свободного пролина в побегах и корнях как Т0-проростков, так и контрольных вариантов опыта (рис.).

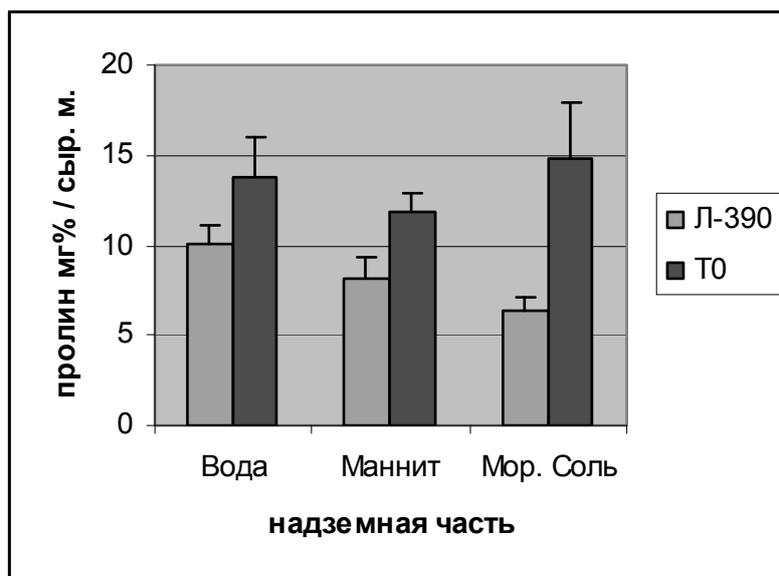
В н. у. выращивания содержание свободного пролина у Т0-проростков достоверно превышало этот показатель контроля (ЛЗ90). В корнях это превышение составило – 3,8, а в побегах – 1,4 раза. Вероятно, повышенный уровень свободного пролина в Т0-проростках относительно контроля является отражением частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы кукурузы. Отметим, что чётко выраженные различия в содержании Pro наблюдаются также между корнями и побегами анализируемых вариантов.

Полученные данные показали, что 4-х часовые осмотические стрессы вызывали заметные изменения в содержании свободного пролина во всех анализируемых вариантах кукурузы. В контроле, происходили синхронные разнонаправленные вариации содержания аминокислоты в ответ на водный дефицит и засоление: увеличение в корнях и уменьшение в побегах. В то же время в органах Т0-проростков наблюдалась неоднозначная ответная реакция: резкое падение в корнях и небольшие вариации в побегах. При этом в течение столь короткого периода пребывания в условиях водного дефицита и засоления суммарное содержание

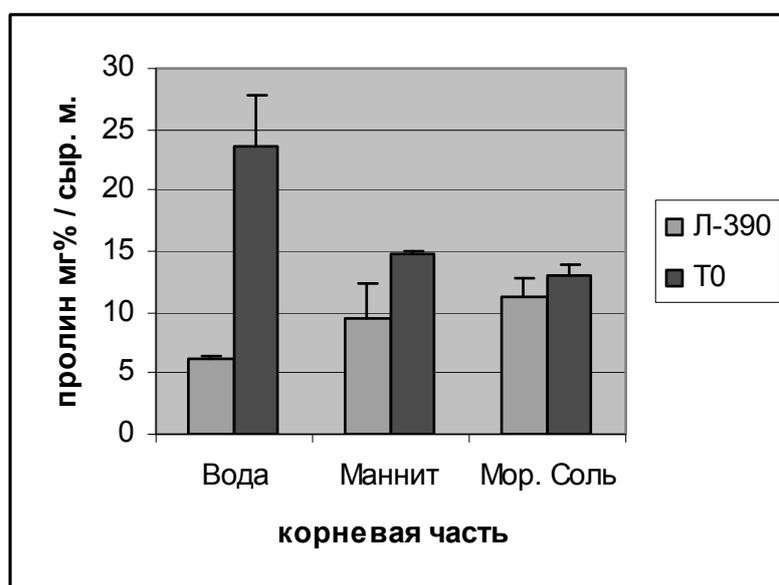
Pro в проростках контроля поддерживалось на одном и том же уровне, тогда как в трансформированных вариантах – почти двухкратно снижалось. Однако, несмотря на снижение, уровень *Pro* в корнях и побегах Т0-проростков был выше, чем в контрольных вариантах (ЛЗ90).

Поскольку осмотические стрессы создавались водными растворами, то измеренный свободный пролин имел эндогенное происхождение. Согласно общепринятому положению [4], содержание этой аминокислоты является результатом координированной регуляции синтеза, катаболизма и транспорта, вместе с тем данные о белках переносчиках *Pro* растений крайне ограничены [5]. Исходя из быстрой аккумуляции *Pro* в корнях при одновременном его эквивалентном снижении в побегах контрольных вариантов, можно предположить, что важную роль на начальных этапах развития осмотических стрессов может играть транспорт аминокислоты в корни, поскольку те непосредственно контактируют со стрессорами. В пользу такого предположения свидетельствует также однотипность ответных реакций, индуцируемых разными веществами.

Что касается Т0-проростков, то в побегах и корнях на начальных этапах действия стрессовых факторов, наблюдалась неодинаковая ответная реакция. Поскольку речь идёт о трансформантах кукурузы, содержащих дцРНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы, которая наиболее активна в митохондриях апекса его корней, теоретически можно было ожидать аккумуляцию *Pro* в корнях. Однако уровень этой аминокислоты, наоборот, существенно снижался, хотя и оставался более высоким, чем в корнях нетрансформированного контроля. С нашей точки зрения, *Pro*, который с максимальным уровнем накапливался в корнях 7-суточных Т0-проростков в н.у., на начальном этапе стрессового воздействия мог активно включаться в биосинтез белков, поддерживая таким образом целостность биополимеров и структурных компонентов клеток [10]. В пользу этого свидетельствуют результаты наших предварительных исследований, в которых показана прогрессивная гибель клеток контроля, проращиваемых в условиях летального обезвоживания и засоления (в течение 7-суток). В то же время трансгенные варианты оставались жизнеспособными и, в частности, в корнях 21-суточных проростков содержался высокий уровень Pro (~130 мг %/ г сырой массы) [11].



а



б

Рис. Содержание свободного пролина в побегах (а) и корнях (б) 7-и суточных проростков кукурузы через 4-часа воздействия моделированным летальным стрессом: обезвоживание (0,8М маннита) или засоление (2,5 % морской соли), вода – н.у. культивирования. Л-390 – (контроль), T0 – проростки, трансформированных *in planta* растений Л-390 с использованием LBA4404 (pBi2E)

Что касается летального обезвоживания, то в побегах проростков, предварительно культивируемых 4 суток в н.у., а затем 10 суток при стрессе, уровень этой аминокислоты возрастал ~20-кратно (в печати).

Представленные данные свидетельствуют о быстрых динамичных изменениях в содержании свободного пролина в корнях и побегах проростков, что сопряжено с поддержанием их осмотического статуса. В то же время повышение содержания пролина в побегах проростков при засолении может указывать на реализацию протекторной его роли от токсического действия ионов Na^+ и Cl^- . При

этом одним из компонентов общей системы генетического контроля, связанной со скоростью, динамикой изменения и специфичностью накопления свободного пролина, является ген пролиндегидрогеназы кукурузы.

Выводы

1. Значительные изменения в содержании свободного пролина в корнях и побегах проростков кукурузы на первоначальном этапе действия летального обезвоживания и сульфатно-хлоридного засоления, реализуются уже в течение нескольких часов.

2. Установлена органоспецифичность

аккумуляции свободного пролина инбредной линии и линии, несущей дцРНК супрессор гена пролиндегидрогеназы, в ответ на разные осмотические стрессы. В контрольных растениях L-390 уровень свободного пролина на начальных этапах стресса в побегах уменьшался, а в корнях увеличивался. В побегах-T0 проростков уровень свободного пролина определялся типом осмотического стресса: снижался в присутствии маннита и

возрастал при засолении, относительно контрольных показателей.

3. Одним их компонентов общей системы генетического контроля, связанной с изменением содержания свободного пролина на ранних этапах стрессового ответа, является ген пролиндегидрогеназы кукурузы.

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

Литература

1. Wu C.-A., Yang G.-D., Meng Q.-W., Zheng C.-C. The cotton *GhNH1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – м 45, N 5. – P. 600–607.
2. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // *Planta.* – 2003. – 218. – P. 1–14.
3. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation // *Planta.* – 2005. – 222. – P. 70–79.
4. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* – 2010. – 15. – P. 89–97.
5. Kishor P.B.K., Sangam S., Amruta R. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Curr. Sci.* – 2005. – 88. – P. 424–432.
6. Lehman S., Funck D., Szabados L., Rentch D. Proline metabolism and transport in plant development // *Amino acid.* – 2010. – 39, N 4. – P. 949–962.
7. 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.
8. Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. – К.: Логос, 2013. – 211 с.
9. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourm* // *Известия Академии Наук Молдавской ССР.* – 1981, № 4. – С. 55–60.
10. Stein H., Honig A., Miller G. et al. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants // *Plant Sci.* – 2011. – 181. – P. 140–150.
11. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных *in planta* с использованием LBA4404, несущего РВ12Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // «Известия Самарского научного центра РАН». – 2013. – № 3, № 5. – С. 1662–1666.

SERGEEVA L.E., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M., TISHCHENKO E.N.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

THE CHANGES OF THE FREE PROLINE CONTENTS IN THE DIFFERENTIAL TISSUES OF CORN SHOOTS UNDER INITIAL STAGES OF OSMOTIC STRESSES

Aim. Salt and water stresses essentially decrease viability and productivity of crop plants. There are some biotechnological approaches to raise the level of the stress resistance. The genetic transformation is among them. The procedure of maize *Agrobacterium*-mediated transformation using LBA 4404 strain with antisense proline dehydrogenase gene suppressor was created and L-390-T0 progeny was obtained. It was necessary to investigate the free proline contents in various plant tissues under normal and stress conditions.

Methods. 7-day old corn plants (genotypes L-390 and L-390-T0) were exposed to salinity (2.5 % of sea water salts) or water stress (0.8 M mannitol) during four hours. The free proline levels in shoots and roots were monitored. **Results.** In tissues of L-390-T0 plants the free proline levels exceeded these parameters of L-390 plants under both normal and stress conditions. It was shown the particular changes of free proline levels in shoots and roots of 7-day corn plants (genotypes L-390 and L-390-T0) under initial stages of stress pressure of lethal salinity or water stress. The gene of PDH-is the component part of the general genetic system that regulates the proline level under initial stages of lethal osmotic stresses.

Key words: corn, *Agrobacterium*-mediated transformation, salinity, water stress, resistance, proline.